

Aus der chirurgischen Klinik und Poliklinik  
für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mittlmeier

# Die Rolle von CD44 und CCR3 bei der rheumatoiden Arthritis in einem Tiermodell der Kollagen-induzierte Arthritis

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Björn Lembcke  
aus Rostock, geboren in Schwerin  
Rostock 2018

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. P. Gierer

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Müller-Hilke

3. Gutachter: Herr Priv. Doz. Dr. med. Jörn Kircher

Tag der Promotionsverteidigung: 25.09.2018

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	4
1.1	Pathophysiologie im Überblick.....	5
1.2	Leukozyten-Endothel-Interaktion .....	11
1.3	Adhäsionsmoleküle.....	12
1.4	CCR3.....	14
1.5	CD44.....	16
1.6	Ziel der Studie.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Versuchstiere .....	19
2.2	Induktion der CIA .....	19
2.3	Versuchsgruppen.....	20
2.4	Arthritisscoring .....	21
2.5	Anästhesie und chirurgische Präparation .....	22
2.6	Intravitalfluoreszenzmikroskopie und Bildverarbeitung .....	23
2.7	Statistische Methoden.....	26
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Arthritisscore.....	27
3.2	Funktionelle kapillare Dichte .....	27
3.3	Blutflussgeschwindigkeit.....	28
3.4	Venolenoberfläche .....	29
3.5	Leukozytenflux.....	30
3.5.1	Rollende Leukozyten.....	31
3.5.2	Fraktion rollender Leukozyten .....	32
3.6	Absolutanzahl adhärenter Leukozyten.....	33
4	Diskussion.....	35
4.1	Diskussion der Methode .....	39
4.2	Kollagen induzierte Arthritis .....	40
4.3	Auflichtilluminationsfluoreszenzmikroskopie und chirurgische Präparation ..	45
4.4	Diskussion der Ergebnisse .....	48
4.4.1	CCR3 Blockierung - DBA/1J Stamm .....	50
4.4.2	CD44 Knockout - B10.Q Stamm .....	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literaturverzeichnis .....	56
7	Anhang .....	74

# 1 Einleitung

Die rheumatoide Arthritis wird bei etwa 1-2% der Bevölkerung diagnostiziert und ist damit die häufigste chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung (Symmons et al., 2002). Mit zunehmendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit für das Erkranken an, so dass das typische Manifestationsalter zwischen dem 40. und dem 60. Lebensjahr liegt. Das weibliche Geschlecht ist häufiger betroffen (Abdel-Nasser et al., 1997). Liegt zusätzlich eine genetische Prädisposition, vor z.B. mit HLA Typ DRB1 oder DR4, so steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit um das 5-10fache (Fries et al., 2002). Die Erkrankung beginnt oft unspezifisch und fällt später durch Entzündungen der Gelenke auf. Unbehandelt verläuft sie im allgemeinen chronisch-progredient, gelenkdestruierend, polyarthrotisch mit Steigerung der Mortalität. Voruntersuchungen zeigen, dass Leukozyten mit einer vermehrten Expression des Chemokinrezeptors CCR3 und des Oberflächenantigens CD44 reagierten. Daher kommt es zu der Vermutung, dass CCR3 und CD44 bei der Interaktion mit dem periartikulären Gefäßendothel eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arthritis spielen (Gierer et al., 2005). Diese Arbeit untersucht mit der Multifluoreszenz-Intravitalmikroskopie den Einfluss von CCR3 und CD44 auf die Mikrozirkulation und zelluläre Inflammation am Mausmodell der Frühphase der Kollagen-II-induzierten Arthritis (CIA).

## 1.1 Pathophysiologie im Überblick

Erst am Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte sich ein Verständnis für die Pathogenese der RA auf zellulärer und immunologischer Ebene, als das Konzept der autoimmunen Hyperreagibilität postuliert wurde. Den Grundstein dafür lieferten Waaler et al. 1939 und Rose et al. 1948, die mit dem Nachweis von Rheumafaktoren bei Patienten mit RA den Autoimmunaspekt erkannten. Kunkel et al., gelang es schließlich, zu zeigen, dass Autoantikörper, die sich mit ihrer Fc-Region an Immunglobuline binden, die Struktur der Rheumafaktoren bilden (Franklin et al., 1957). Diese Autoimmunkomplexe aktivieren C5a und beziehen das Komplementsystem in die periartikulären Entzündungen mit ein (Franklin et al., 1957).

Aus der Beteiligung von Leukozyten und HLA Typ II Genen am Krankheitsprozess folgerten Stastny et al. das Vorhandensein einer Antigenpräsentation und verbinden mögliche exogene und endogene Pathogenesefaktoren (Stastny et al., 1976). Um einen Einblick in die RA zu bekommen, ist es nötig, die Interaktionen zwischen den beteiligten Zellen z.B. durch Zytokine, Interleukine und Oberflächenantigene zu ergründen. Seit den späten achtziger Jahren ist es möglich, diese in Geweben und Flüssigkeiten nachzuweisen. Das förderte die Erkenntnis zu Tage, dass eine Vielzahl von Interleukinen, Interferonen und anderen Faktoren eine Rolle in den Zellinteraktionen spielen (Smeets et al., 1998; Williams et al., 1994). In den neunziger Jahren wurde die Vorstellung etabliert, dass durch Interleukin-Netzwerke intraartikuläre pathologische Prozesse von Fibroblast-like und Markophage-like-Zellen unterhalten werden und die umgebenden inflammatorischen Zellen zur lytischen Enzyymbildung einbeziehen. Somit konnte die Verbindung zur Gelenkdestruktion erschlossen werden. Eine zentrale Rolle im Pathomechanismus spielen die von Gracie et al. publizierten Interleukine, u.a. IL 18 und vor allem das TNF- $\alpha$  als zentrale Entzündungsmediatoren (Gracie et al., 1999). In den folgenden Jahren wuchs das Verständnis für die beteiligten Rezeptoren auf Osteoklasten, Osteoblasten und aktivierenden T-Zellen. Herauszuheben ist hier sicherlich die Beschreibung der sog. RANKL (receptor activator of nuklear factor B ligand), der eine zentrale Rolle in diesem Teil des pathologischen Prozesses der RA einnimmt (Kong et al., 1999). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass zwar die Knochendestruktion durch Modifizierung der RANK/RANKL-Funktion positiv beeinflusst wurde, die Entzündungszeichen und

die Knorpeldestruktion jedoch nicht oder nur sehr minimal verbessert wurde (Pettit et al., 2001).

Zwillingsstudien belegen, dass der genetische Beitrag zur RA-Pathogenese bei etwa 60% liegt (Wiik et al., 2007). Zum Verständnis der an der Pathogenese beteiligten Faktoren legten die Forschung auf genetischer Ebene nahe. Dort sind die Genexpressionen im Fokus, welche die Inflammationen möglicherweise regulieren. Hierzu publizierten Tak et al. eine Reduktion der Gelenkentzündung durch intraartikulären Gentransfer (Tak et al., 2001). Okada et al. beleuchteten in einer genetischen Studie grundlegende Gene, Wege und Zelltypen, die an der Pathogenese der RA beteiligt sind. 98 biologische „Kandidatengene“ konnten detektiert werden (Okada et al., 2014). Durch das Verständnis für die Entwicklung der Pathogenese ist man sich heute darüber einig, dass es nicht den einen Krankheitsauslöser gibt. Eine Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren sind durch ihre komplexen Interaktionen an der Pathophysiologie beteiligt. Daraus ergibt sich die große Anzahl von Therapieansätzen. Ein ausreichendes Wissen über die Ätiologie und die Pathogenese der RA existiert bis heute nicht. Momentan befinden wir uns in der Postgenom-Ära. Die Genomsequenzierung hat eine Beschleunigung nach der Suche von pathologischen Ablaufprozessen bewirkt und eine Fülle von möglichen Therapiezielen s.g. Targets aufgedeckt. Untersuchungen an Mausmodellen der CIA erbrachten 60 Genloci, welche mit der Pathogenese in Verbindung gebracht werden (Ibrahim et al., 2006). Die Publikation von Tu-Rapp et al. über die Verbindungen zwischen genotypischen Daten für Oberflächenantigene CD44, CCR3 und der Leukozyten-Endothel-Interaktion haben deutliche Korrelationen nachgewiesen (Tu-Rapp et al., 2010). Gierer P. et al. konnten dies in weiteren Versuchen bei CIA an DBA/1J bestätigen (Gierer et al., 2005).

Exogene unspezifische Faktoren wie allgemeiner Stress und Rauchen werden als ungünstige Einflüsse angesehen (Klareskog et al., 2007; McInnes et al., 2007). Sie kommen jedoch als initial-kausale Ursache nicht in Frage. Interessanterweise ist der exogene RA-Risikofaktor Rauchen mit der ACPA (anti citrullinated peptide/protein antibodies) -positiven RA-Variante assoziiert. ACPA sind hochsensitive und -spezifische Seromarker der RA. Insbesondere die Spezifität der ACPA (bis >95 %) übertrifft bei Weitem die des Rheumafaktors (Gross et al., 2009). ACPA haben sich als gute Prädiktoren einer rasch progredienten Gelenkzerstörung durch die erosive Arthritis erwiesen (Syversen et al., 2008). Der erhöhte Anteil von Zellen mit citrullinierten Proteinen in der bronchoalveolären Lavage bei Rauchern hat

möglicherweise pathogenetische Bedeutung. Somit werden Ansätze einer zukünftigen Risikostratifizierung für RA-Patienten unter Berücksichtigung des ACPA-Serostatus und genetischer Marker erkennbar.

Als initial-kausale Ursache werden die immunologischen Interaktionen mit Mikroorganismen wie z.B. CMV, EBV und anderen Krankheitserregern in Betracht gezogen. Diese Mikroorganismen exprimieren Oberflächenantigene, die auch im Gelenkknorpelgewebe zu finden sind (Fujinami et al., 1988; Roudier et al., 1988). Das sind u.a. das gp39, Proteoglykane und das hier verwendete Kollagen Typ II (Cope et al., 1999; Banerjee et al., 1992; Kim et al., 1999). Treffen diese exogenen Komponenten auf Individuen mit endogener Prädisposition, z.B. einer Expression von einigen HLA DR4 oder HLA DRB1 Subtypen, so besteht eine erhöhte Neigung, an einer RA zu erkranken. Es gibt weitere Gene des HLA Komplexes und des Nicht-HLA-Komplexes, die für die Erkrankungsneigung verantwortlich gemacht werden. Zum Teil stimmen sie mit Genen für die Prädisposition maligner Tumoren überein (Okada et al., 2014). Die RA ist die durch verschiedene Leukozytensubpopulationen sowohl im sich entwickelnden Pannus als auch im Synovialraum gekennzeichnet. Die Identifizierung von T-Helfer (TH) 17-Zellen nimmt eine wichtige Rolle in der Immunpathogenese der RA und CIA ein. Einen schematischen Überblick von Rolle der TH17-Zellen gibt die Abbildung 1.

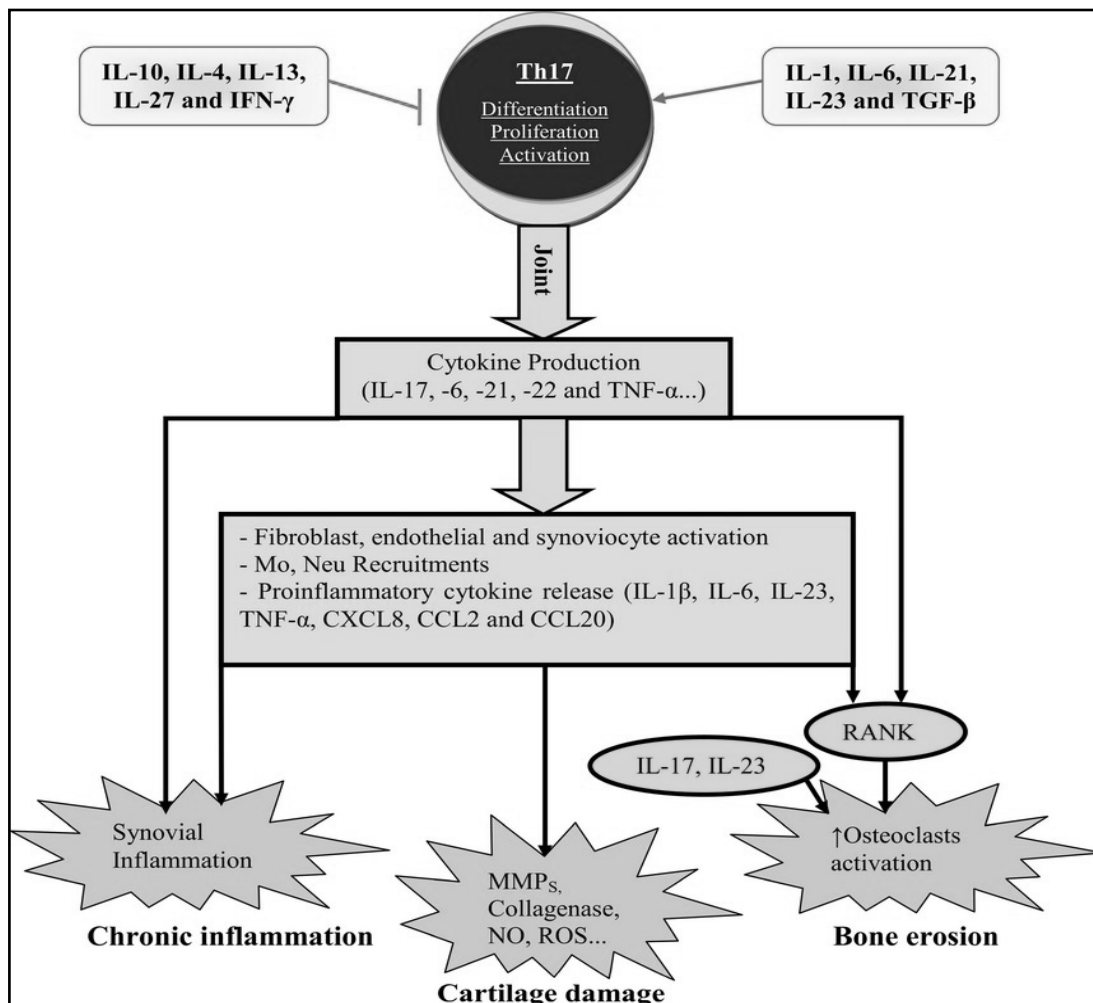


Abbildung 1: TH17-Zelle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. In den entzündeten Gelenken produziert TH17 inflammatorische Zytokine zur Aktivierung von Osteoklasten und Makrophagen und rekrutiert auch Leukozyten. Die infiltrierten Leukozyten produzieren ihrerseits Zytokine, Chemokine. Gewebe zerstörende Enzyme führen zu chronischen Entzündungen, Knorpelschäden und Knochenerosion. IL, Interleukin; Mo, Monozyt; Neu, Neutrophile; MMP, Matrix-Metalloproteinase; NO, Stickoxidsynthase; ROS, reaktive Sauerstoffspezies, (Azizi et al. 2013)

Werden "synovialnaiven" Leukozyten die o.g. Proteine präsentiert, kommt die immunologische Kaskade in Gang. Stark vereinfacht kann der Krankheitsverlauf grob in 3 Phasen untergliedert werden:

1. Lymphoide Phase, in der es zur Ausprägung der Autoimmunität kommt.

Klinische Zeichen sind nahezu nicht nachweisbar. Aktivierte Leukozyten, Zytokine, Autoantikörper (z.B. ACPA, RF) und andere Entzündungsmediatoren sind serologisch bereits persistent. Diese Phase kann über einen individuellen Zeitraum unbemerkt ohne klinische Symptome bestehen. Das greift der hier verwendete Versuchsaufbau auf, indem man davon ausgeht, dass die CIA sich 4 Wochen nach Induktion in der 1. Phase befindet.



2. Übergangsphase, in der erste klinische Symptome mit latentem Fieber, Abgeschlagenheit und Müdigkeit wahrgenommen werden. Paraklinisch steigen die Entzündungsparameter an.

3. Artikuläre Phase, in der sich das typische klinische Bild der Rheumtoiden Arthritis mit Gelenkentzündung ausprägt. Histologische Untersuchungen von betroffenen Gelenken zeigen irreversible Destruktionen des Knorpelgewebes und später auch der angrenzenden Knochenstrukturen (McInnes et al., 2007).

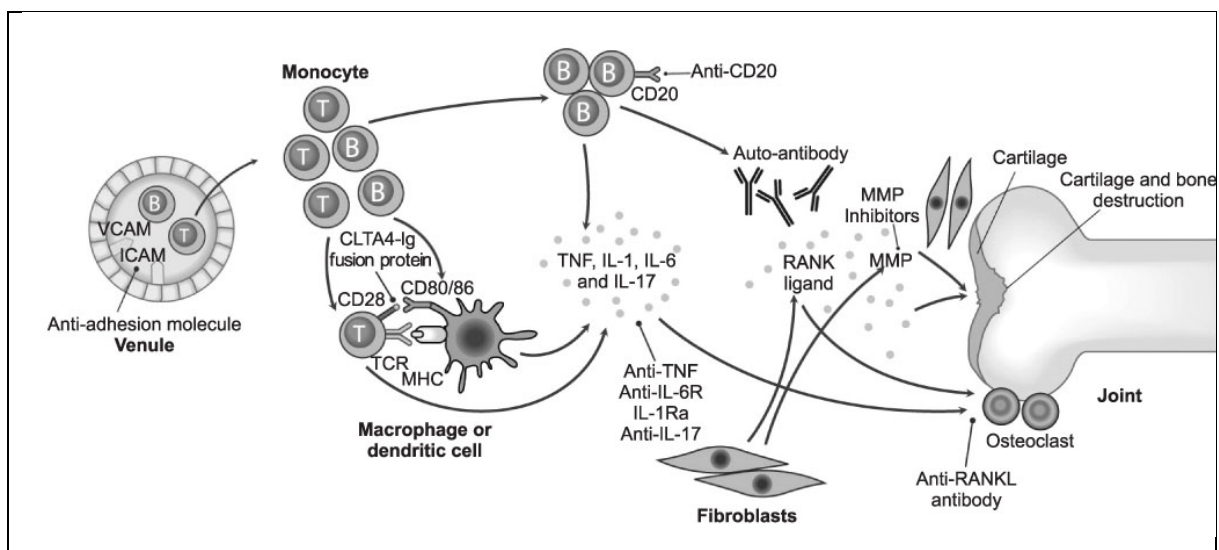


Abbildung 2: Pathogene der RA ab der Extravasion von T-Lymphozyten (incl. TH17-Zellen), B-Lymphozyten und Makrophagen, die mit zum Teil ortständigen Makrophagen, Fibroblasten Chondrozyten und Osteoclasten interagieren und eine Knorpel-Knochendestruktion bewirken inkl. möglicher Therapieoptionen. RANK=Rezeptor-Aktivator des Kernfaktors- $\kappa$ B; RANKL=RANK-Ligand; TCR=T-Zell-Rezeptor; TGF- $\beta$ =transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ ; TH=T-Helferzelle; TLR=Toll-like Rezeptor; (Yoo et al., 2010)

Die Verbindung mit Änderung der Biomechanik und Abnahme der mechanischen Belastbarkeit bewirkt in der Summe die fortschreitende Gelenkzerstörung (Firestein et al., 2003; Bellucci et al., 2016). Unklar ist der Zusammenhang zwischen der Pathogenese und den Komorbiditäten. Eine Untersuchung von über 3900 Patienten zeigte, dass eine erhöhte Prävalenz von malignen Entartungen, ischämischen kardiovaskulären, pulmonalen Erkrankungen, Reduktion der Knochendichte und psychischen Erkrankungen mit der RA vergesellschaftet ist (Dougados et al., 2014; Kleinert et al., 2011). Der humane Krankheitsverlauf gestaltet sich sehr individuell und erschwert somit die Diagnosestellung. Um eine Hilfestellung für die frühere Diagnosesicherung zu geben, publizierte das American College of Rheumatologie (ACR) einen Fragenkatalog der bei positiver Beantwortung von 4 der 7 Kriterien nahezu sicher für eine RA spricht (Arnett et al., 1988). Im Verlauf wurden sie von der

EULAR (European League Against Rheumatism) 2010 überarbeitet. Die in dieser Parameterauswahl noch miterfassten Rheumafaktoren wurden und werden zunehmend von den ACPAs oder Antikörper gegen citrullinierte Proteine abgelöst. In neuerer Zeit haben die Testsysteme zum serologischen Nachweis der ACPAs die klassische Serodiagnostik über die Rheumafaktoren entscheidend verbessert. Etwa 60 % der RA-Patienten sind ACPA-positiv. Krankheitsverlauf und Gelenkdestruktion sind schwerer bei ACPA-positiven (Meyer et al., 2003). Diese Autoantikörper erkennen citrullinierte Epitope, bei der die Umwandlung der Aminosäure Arginin zu Citrullin durch Deaminierung erfolgt. Bei der Citrullinierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation des jeweiligen Proteins. Dieser Prozess kommt physiologischerweise während der Apoptose vor. In der Synovialis finden sich bei der RA citrullinierte Proteine. Die citrullinierten Epitope stellen die Zielstruktur für die Antikörper beziehungsweise ACPA dar, die man sowohl in zirkulierenden Immunkomplexen als auch in der Synovialflüssigkeit bei der RA finden kann (Caspi et al., 2006). Sind ACPA bei anderen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes oder der Psoriasis-Arthritis nachweisbar, muss auch dort mit einem erosiven Verlauf der Arthritis gerechnet werden. (Gross et al., 2009).

A. Gelenkbeteiligung	1 großes Gelenk	0
	2-10 große Gelenke	1
	1-3 kleine Gelenke (+/- große Gelenke)	2
	4-10 kleine Gelenke (+/- große Gelenke)	3
	>10 Gelenke (mind. 1 kleines Gelenk)	5
B. Labordiagnostik (mind. ein Parameter, ACPA, RF)	negative RF oder ACPA	0
	gering positive RF oder ACPA	2
	stark erhöhte RF oder ACPA	3
C. Akute Phase Reaktion (mind. ein Parameter, CRP, BSG)	normales CPR o. BSG	0
	erhöhtes CRP oder BSG	1
D. Symptombdauer	< 6 Wochen	0
	> 6 Wochen	1

Tabelle 1: EULAR Kriterien (bei mind. 6 Punkten gilt die RA als sicher) (Aletaha et al., 2010; Corrao et al., 2015)

## 1.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Die entzündungsrelevante Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten beruht auf komplexen Wechselwirkungen zwischen Oberflächenantigenen der Leukozyten und den Endothelzellen in postkapillaren Venolen (Springer et al., 1994). Das Abfangen und Rollen unter laufendem Blutfluss wird hauptsächlich über die Anbindung von Rezeptoren der Selektin-Familie wie Adhäsionsrezeptoren (L, E und P Selektine) und ihren Liganden vermittelt (Gal et al., 2005). Die Geschwindigkeit des Rollprozesses wird durch den Leukozytentyp und die Dichte der Adhäsionsmoleküle auf den Zelloberflächen bestimmt (Springer et al., 1994). Nach dem Modell der transendothelialen Migration (TEM) werden Leukozyten aus dem Blutstrom rekrutiert, dann über Aktivierung hin zu einer Adhäsion mit folgender Migration überführt. Vermittelt wird dies durch chemokinaktivierte Leukozytenintegrine und ihre Ig-ähnlichen Liganden auf den Endothelzellen. So entsteht eine integringeförderte Adhäsion von Leukozyten an das Endothel.

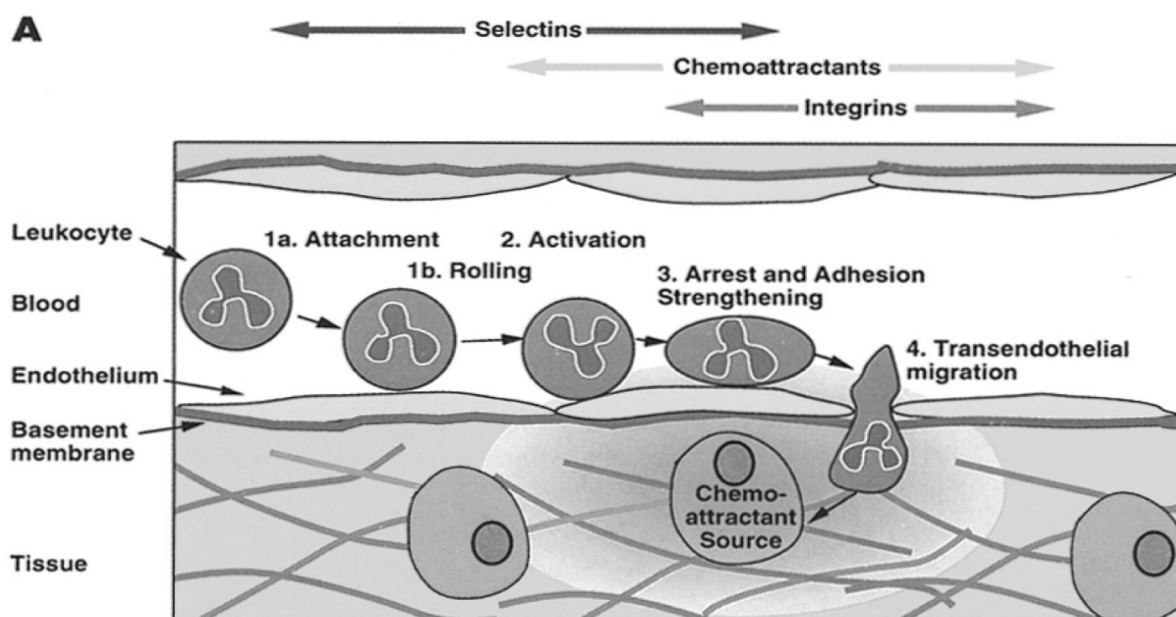


Abbildung 3: Schema der transendothelialen Migration von Leukozyten nach Springer (Springer et al. 1994).

Die Leukozytenextravasation wird durch eine Vielzahl von Adhäsions- und Signalmolekülen begleitet. Sie machen auf der apikalen Oberfläche von Endothelzellen eine Art Kriechbewegung bis zu einem Ort, der zur Diapedese geeignet ist. Während diese Schritte gut verstanden sind und die Adhäsionsmoleküle zur Interaktionen weitgehend identifiziert wurden, ist die eigentliche Migration von

Leukozyten durch die endotheliale Zellschicht und die darunterliegende Basalmembran relativ unklar. In den meisten Fällen ist nicht bekannt, welche molekularen Prozesse dies tatsächlich regeln. Ab der TEM geht man von einem irreversiblen Prozess aus. Leukozyten, die an der postkapillaren Venole in den Entzündungsprozess eingreifen, können nicht mehr in ihre ursprüngliche Struktur zurückkehren (Muller et al., 2007). Auf ein Teil der beteiligten Adhäsionsmoleküle und Liganden wird in den weiteren Abschnitten eingegangen, insbesondere auf CCR3 und CD44.

### 1.3 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle sind eine große Gruppe von Glykoproteinmolekülen auf Körperzelloberflächen. Sie vermitteln die Kommunikation zwischen den Zellen im Knochenmark, Leukozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und der extrazellulären Matrix. Sie werden in drei Gruppen eingeteilt.

1. Selektine
2. Integrine
3. Leukozytäre Liganden

Die funktionelle und quantitative Expression der Adhäsionsmoleküle kann durch intrazelluläre und extrazelluläre Faktoren beeinflusst werden. Intrazelluläre Prozesse werden beispielsweise bei Virusbefall wirksam. Extrazelluläre Prozesse wie z.B. Stimulation durch Interleukine erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen. Im Rahmen inflammatorischer Prozesse steuert die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle wesentliche Anteile der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Hoffbrand et al., 2003).

#### 1. Selektine:

Endothelzellen können P- und E-Selektin auf der Zelloberfläche exprimieren. Der extrazelluläre Anteil weist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Lektin-Domäne auf, die spezifisch an Kohlenhydrat-Seitenketten ihrer Liganden bindet. Zur Identifikation von Zielzellen dient eine „epithelial growth factor“ (EGF)-Domäne. Daneben finden sich eine variable Anzahl kurzer Sequenzen. Intrazellulär ist an die Transmembrandomäne ein kurzer zytoplasmatischer Bereich angeschlossen (Kansas et al., 1996).

P-Selektin wird präformiert in Vesikeln gespeichert und innerhalb von Minuten nach Stimulation an der Oberfläche präsentiert. Das Molekül ist nur für 5-15 min auf der Zelloberfläche nachweisbar. Es vermittelt in der Interaktion mit granulozytärem L-Selektin die lockere Assoziation und das Rollen von Leukozyten (McEver et al., 2005). E-Selektin wird erst nach ca. vierstündiger proinflammatorischer Stimulation maximal auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert. Im Gegensatz zu P-Selektin wird E-Selektin unter der Kontrolle u.a. des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B transkriptionell reguliert. Daher spielt E-Selektin in späteren Phasen der Entzündung eine wichtige Rolle (Lawrence et al., 1993). Experimente mit P- und E-Selektin-defizienten Mäusen zeigten eine reduzierte Sterblichkeit in Peritonitismodellen, jedoch nur teilweise Effekte auf die Rekrutierung der Entzündungszellen zum Ort des Geschehens (Bulut et al., 2002).

## 2. Integrine:

Integrine wie z.B. ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 sind interzelluläre Adhäsionsmoleküle und Mitglieder einer heterogenen Familie von Glykoproteinen. Sie setzen sich aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammen und enthalten eine Transmembran-Domäne (TMD) sowie einen zytoplasmatischen Anteil. Anhand der  $\beta$ -Kette erfolgt die Einteilung der Integrine in Gruppen  $\beta$ 1- $\beta$ 3 (Coughlin et al., 2001). Neben der Vermittlung von Zelladhäsionen übertragen Integrine Signale über die Plasmamembran, die die Zellmigration, das Zellüberleben und das Wachstum regulieren. Signale aus dem Zelleninneren können die Affinität für Liganden erhöhen (Ginsberg et al., 2014). ICAM-1 (CD54) wird neben Endothelzellen und Leukozyten auf anderen ortständigen Zellen (z.B. Epithelzellen, Fibroblasten) nachgewiesen (Hubbard et al., 2000). Wie E-Selektin wird auch ICAM-1 auf ruhenden Zellen gering exprimiert und erst durch proinflammatorischer Stimulation hochreguliert. Nach ca. 18-24 h wird die maximale Konzentration erreicht (Ledebur et al., 1995; Schnoor et al., 2015). ICAM-2 (CD102) wird vor allem fest auf Endothelzellen exprimiert. Die extrazelluläre Domäne des einkettigen Glykoproteins dient vermutlich hauptsächlich als Ligand für die  $\beta$ 2-Integrine, LFA-1 und MAC-1 auf Granulozyten (Lyck et al., 2015). VCAM-1 (CD106) wird unter entzündlichen Zuständen auf aktivierten Endothelzellen exprimiert. Ansonsten zeigen Endothelzellen nur eine geringe Expression von VCAM-1. Die Steigerung der transkriptionell regulierten Expression ist nach ca. 2-4 Stunden nachweisbar, das Maximum wird nach ca. 16-24 h auf der endothelialen Oberfläche

erreicht. Die Integrin-Expression wird unter den entzündlichen Zuständen durch eine Vielzahl von Signalen stimuliert (Bloemen et al., 1993; Schlesinger et al., 2015).

### 3. Chemokine als leukozytäre Liganden:

Chemokine sind eine große Familie von kleinen Zytokinen und haben im Allgemeinen ein niedriges Molekulargewicht im Bereich von 7-15kDa. Chemokine und ihre Rezeptoren sind in der Lage, die Migration und den Aufenthalt aller Immunzellen zu kontrollieren. Einige Chemokine gelten als entzündungshemmend. Ihre Freisetzung kann während einer Immunantwort an einem Infektionsort induziert werden, während andere als homöostatisch gelten und an der Kontrolle der Zellmigration beteiligt sind. Die physiologische Bedeutung dieser Familie von Mediatoren ergibt sich aus ihrer Spezifität ihren Rezeptoren gegenüber. Mitglieder der Chemokinfamilie veranlassen die Rekrutierung von klar definierten Leukozytenuntergruppen. Es gibt zwei große Chemokin-Unterfamilien. Sie basieren auf der Cystein-Reste-Position, CXC und CC. Grundsätzlich sind Mitglieder der CXC-Chemokine für Neutrophile chemotaktisch, und CC-Chemokine sind für Monozyten und Subtypen von Lymphozyten chemotaktisch, obwohl es einige Ausnahmen gibt (Palomino et al., 2015).

## 1.4 CCR3

CCR3 ist ein Chemokinrezeptor für Eotaxin. Er ist wie alle Chemokinrezeptoren G-Protein-gekoppelt mit Transmembran-Domänen. Diese sind in der Lage, mehrere unterschiedliche Chemokine zu binden. Auf Basis der Chemokinklassifikation sind auch die Rezeptoren benannt. CXCR1,2,3,4 und 5 binden CXC Chemokine, CCR1 - CCR9 binden Chemokine der Klasse CC (Sallusto et al., 1997). Die meisten Chemokine binden an mehr als einen Rezeptor, und viele Rezeptoren binden mehr als ein Chemokin. Chemokinrezeptoren sind an den Wanderungsmechanismen der Leukozyten zu dem Ort der Entzündung maßgeblich beteiligt. Während Granulozyten eine relativ beschränkte Auswahl von Chemokinrezeptoren besitzen, beanspruchen T-Lymphozyten nahezu alle Rezeptortypen (Amerio et al., 2003). Ihre Expression passt sich dem funktionellen Zustand der Lymphozyten an und wird als Ausdruck für Reife, Differenzierung und Aktivität angesehen. (Sallusto et. al., 1998). Funktionell unterteilt man Chemokine und Chemokinrezeptoren in inflammatorische (induzierbare) und

homöostatische (konstitutive) Chemokinrezeptoren. CCR3 rechnet man zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR8, CXCR3, CXCR6 und CX3CR (Proudfoot et al., 2002). Er kommt in höheren Konzentration auf TH2-Zellen, CD4- und CD8- positiven Makrophagen und Langerhans-Zellen vor (Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1998). Der Reiz auf TH2-Zellen durch CCR3 könnte eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung von weiteren Leukozyten sein (Sallusto et al., 1997). Insbesondere aus Untersuchungen zu allergischen Atemwegsentzündungen und Asthma ist die Rolle für die Migration bekannt (Heath et al., 1997). CCR3 soll auch beim Zelleintritt von HIV-1 involviert sein (Choe H et al., 1996). In osteoarthritis verändertten Gelenken ist die Konzentration von CCR3 ebenso vermehrt wie dessen Ligand Eotaxin, so dass CCR3 auch eine Beteiligung zwischen entzündlicher Degeneration bei Osteoarthritis zugeschrieben wird (Chang X et al. 2016). Auch bei der rheumatoiden Arthritis konnte die erhöhte Konzentration von CCR3 nachgewiesen werden (Liu X et al., 2016).

Eotaxin	CCR3
Eotaxin-2	CCR3
Eotaxin-3	CCR3
RANTES	CCR3, CCR1, CCR5
MCP-1	CCR3, CCR2
MCP-2	CCR3, CCR1, CCR2, CCR5
MCP-3	CCR3, CCR1, CCR2
MCP-4	CCR3, CCR2
MEK	CCR3, CCR10
MIP-5	CCR3
LPS-iCK	CCR3

*Tabelle 2: CCR3-aktivierende Chemokine: LPS-iCK (lipopolysaccharide-induced chemokine) MCP (monocyte chemoattractant protein) MEK (mucosae-associated epithelial chemokine) MIP-5 (macrophage inflammatory protein-5) RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; (Lilly et al., 2010)*

Bekannte antagonisierende Chemokine für CCR3 sind I-TAC, Mig und IP10. (Loetscher et al., 2001). Heath beschrieb erstmalig die Wirkung eines monoklonalen Antikörpers auf CCR3. Dieser monoklonale Antikörper blockierte den Calciumeinstrom und verhinderte eine Aktivierung von Lymphozyten und dadurch auch die weitere Migration (Heath et al., 1997). Es ist bekannt, dass CCR3 mit zahlreichen entzündlichen Zuständen assoziiert ist und mit Gelenkschäden bei der RA korreliert.

Eine verstärkte Expression von CCR3 und erhöhte Konzentrationen von Eotaxin im Plasma deuten darauf hin, dass CCR3-vermittelte Mechanismen eine wichtige Rolle bei RA spielen. Das lässt vermuten, dass Anti-CCR3-Agenzien therapeutische Verwendung für RA haben können (Liu et al., 2017).

## 1.5 CD44

Das heute als CD44 bekannte Glykoprotein wurde erstmals 1980 als Leukozyten-spezifisches membranständiges Glykoprotein für Hyaluronsäure beschrieben (Dalchau et al., 1980). In Unkenntnis der hohen Variabilität des Oberflächenmarkers folgten weitere Nachweise auf verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlicher Namensgebung. Die Liste der Zelltypen erstreckt sich über Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Adipozyten, Astrozyten, Chondrozyten, dendritische Zellen, Endometrium-Zellen, Enterozyten, Epithelzellen, Erythrozyten, Synoviozyten, T-Zellen und eine Vielzahl von Tumor- und Metastasenzellen (Haynes et al., 1989, Picker et al., 1989, Terpe et al., 1994, Marhaba et al., 2008). Das Gen für CD44 umfasst 20 Exons, wovon die ersten 1-5 Exons immer identisch sind, ebenso die Exons 16-20. Die dazwischenliegenden 10 Exons werden variabel exprimiert. Daraus ergibt sich auch die Nomenklatur der Isoformen. Im Fall der Isoform CD44v1 ist das variable Exon 6 exprimiert, und so setzten sich die Bezeichnungen weiter fort (CD44v2 - Exon 7; CD44v3 - Exon 8 usw.). Die Form des CD44 die nur von Exon 1-5 und 16-20 gebildet wird, bezeichnet man als CD44s (s=Standard). In gesundem Gewebe kommt hauptsächlich die Standard-Isoform CD44s vor. CD44s ist ein Typ 1-Transmembran-Glycoprotein aus 341 AS, mit 248-AS-extrazellulärer Domäne, einer 21 AS Transmembran-Domäne und 72 AS Zytoplasmaschwanz (Ponta et al., 2003). Eine weitere Isoform wird als CD44vRA benannt. Sie stellt eine Sonderform des CD44 dar, die auf Zellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen wurde. CD44vRA-positive Zellen interagieren vermutlich mit weiteren proinflammatorischen Leukozyten und unterhalten die Entzündungskaskade im Gelenk der Patienten mit RA (Naor et al., 2003). Durch intraartikuläre Injektion eines monoclonalen Antikörpers gegen CD44vRA bei DBA/1-Mäusen mit CIA konnte eine Reduktion der Gelenkentzündung nachgewiesen werden (Golan et al., 2007). CD44 ist durch die nahezu ubiquitäre Verteilung und die große Zahl von Erscheinungsformen auch an



sehr vielen interzellulären Prozessen und an Interaktionen mit der Extrazellulärmatrix beteiligt. Die Funktionen reichen von der Embryogenese, der Organentwicklung, der Immunmodulation, der Hämatopoese, Homingprozessen von Lymphozyten über die Entzündungsmodulation bis hin zur Tumorphathologie (Zöller et al., 2015). Im Inflammationsprozess ist der wichtigste Ligand die Hyaluronsäure (Pure et al., 2001). Zusätzlich gibt es eine Affinität zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix, z.B. Fibronectin, Kollagen, Osteopontin, verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Jalkanen et al., 1992, Ehnis et al., 1996, Weber et al., 1996, Jones et al., 2000).

Die bekannten Funktionen von CD44 im Rahmen von Inflammationsprozessen sind (Pure et al., 2001):

1. Leukozytärer Adhäsions-Rezeptor mit Hyaluronsäure und aktiviertem Endothel
2. Zell-Matrix-Interaktionen und Lenkung von Zellen zur Inflammation
3. Aktivierung von Signaltransduktion und Induktion von proinflammatorischen Genen
4. Zellaktivierung durch inflammatorische Mediatoren
5. Indirekter Einfluss auf die Granulozytenapoptose
6. Entzündungsmediator (freies CD44)

## 1.6 Ziel der Studie

Entzündliche Gelenkveränderungen durch Leukozytenaktivierungen, Endothelinteraktionen mit zellulären Infiltrationen und das Auslösen einer inflammatorischen Kaskade definieren die RA auf mikrozirkulatorischer Ebene. Im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie zur CIA am Beispiel der Maus wurde eine massive Entzündungsreaktion ausgelöst. Es sollen die antiinflammatorischen Einflüsse von CCR3 und CD44 mittels hochauflösender Multifluoreszenz-Mikroskopie auf die zellulären Entzündungsreaktionen hin dargestellt werden. Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss von CCR3-Antikörper-Applikation und den Effekt eines CD44-Knockouts der Frühphase der CIA im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu untersuchen. Als Parameter für die zelluläre Inflammation dient die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die funktionelle Kapillare Dichte am Hoffa-Fettkörper der Maus.

Folgende Fragestellungen sollen innerhalb dieser Arbeit diskutiert werden:

1. Welchen Einfluss zeigen die CCR3-Antikörper-Applikation und der CD44 Knockout auf die klinische Arthritisausprägung?
2. Welchen Unterschied gibt es in der Mikrozirkulation?
3. Wie wird die Leukozyten-Endothel-Interaktion beeinflusst?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Das Protokoll für diese Versuchsreihe wurde durch das Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt M-V genehmigt und folgt den nationalen Richtlinien für den Umgang und die Haltung von Tieren, die zu wissenschaftlichen Zwecken gehalten und verwendet werden. Die Tierhaltung und Versuchslabore sind im Verwaltungsbereich des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock und dem Land Mecklenburg-Vorpommern. Die Versuche wurden im Januar 2009 durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Standardbedingungen in der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Rostock am Institut für Experimentelle Chirurgie. Während der gesamten Haltungszeit der Tiere bestand ein Zwölf-Stunden-Tag/Nachtzyklus, außerdem hatten die Tiere jederzeit Zugang zu ausreichendem Futter und frischem Wasser.

In der Studie wurden zwei arthritiseempfindliche Mausstämme verwendet.

1. DBA/1J Mäuse (Taconic Farm, Hudson, New York, USA) mit der Eigenschaft, sowohl spontan als auch nach Induktion mit CFA/Kollagen II für die Entwicklung einer Arthritis empfänglich zu sein (Holmdahl et al., 1992), die Empfänglichkeit für die Arthritis basiert auf dem genetischen Hintergrund MHC Haplotyp 2q (MHC-2<sup>q</sup>).
2. B10.Q (MHC-H2<sup>q</sup>)-Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), hälftig mit CD44-Knockout.

### 2.2 Induktion der CIA

Im Alter von 7-8 Wochen erfolgte bei allen Tieren die Induktion der CIA. Dazu wurden 2,5mg/ml Rinderkollagen Typ II (CII) (Chondrex, Washington, USA) in 0,1% Essigsäure gelöst und mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA), welches 4mg/ml Mycobacterium tuberculosis (Difco, Karlsruhe) enthielt, emulgiert. Es wurden jeder Maus 100µl der Emulsion intradermal am Schwanzansatz injiziert. Auf eine Boosterinjektion wurde verzichtet.

## 2.3 Versuchsgruppen

Ziel dieser Studie war es, in der Frühphase der CIA mittels intravitraler Multifluoreszenz-Mikroskopie die zelluläre Entzündungsreaktion zu untersuchen, zu charakterisieren und somit den Einfluss von CCR3 und CD44 auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion *in vivo* darzustellen. Dazu wurden in zwei Gruppen unterschieden und jeweils 10 Tiere vom DBA/1J- und B10.Q-Stamm eingeschlossen. Bei allen 20 Tieren erfolgte im Alter von 7-8 Wochen die CIA-Induktion mit Kollagen II/CFA (CII/CFA), ohne weitere Immunisierung. 5 DBA/1J-Tieren wurden am 21., 24. und 27. Tag jeweils 50 µg eines monoklonalen CCR3-Antikörpers (MAB1551 der Firma R&D Systems) s.c. injiziert, den anderen 5 Tieren 50µg eines Kontroll-AKs. Die 10 B10.Q Tiere erhielten zwischen der CIA-Induktion und Zeitpunkt der Multifluoreszenz-Mikroskopie (28. Tag) keine Behandlung.

### DBA/1J-Serie:

#### 1. CCR3-Antikörper:



#### 2. Kontroll-Antikörper:



### B10.Q-Serie:

#### 1. CD44 +/+



#### 2. CD44 -/-

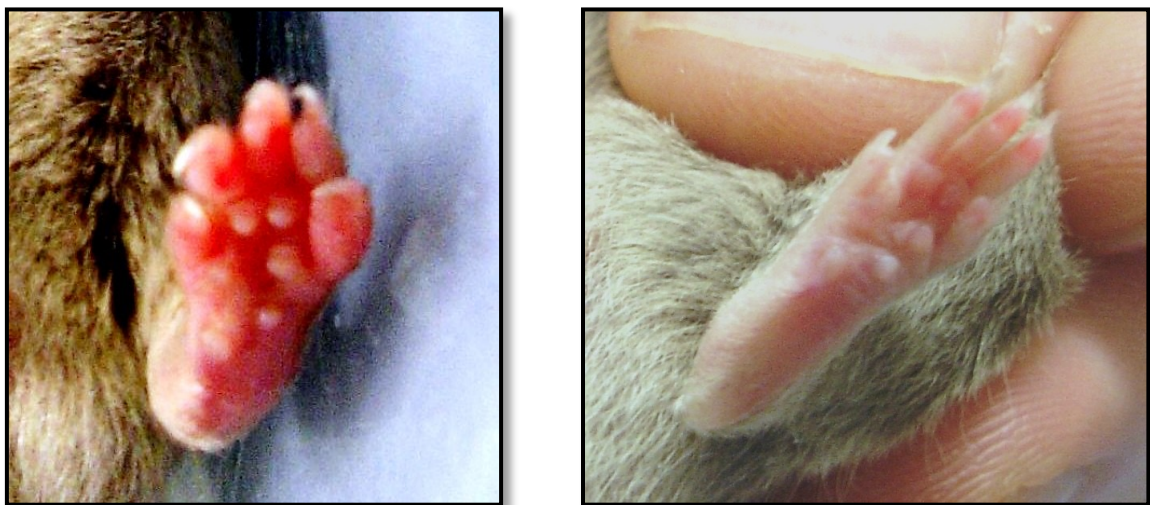


## 2.4 Arthritisscoring

Die Studie bezieht sich auf die Frühphase der Arthritis, dennoch kann es zu diesem Zeitpunkt zu den typischen klinischen Entzündungszeichen an einigen Tieren kommen. Um die Ausprägung der Gelenkveränderungen darzustellen, wurden alle Mäuse vor Versuchsbeginn auf klinische Veränderungen untersucht. Zur quantitativen Erfassung wurde das von Nandakumar beschriebene Scoringssystem verwendet.

Punkte	Beschreibung
0	Keine Arthritiszeichen
+ 1	Ein Punkt je geschwellenem oder gerötetem Zeh
+ 5	Komplette Pfotenschwellung
+ 5	Sprunggelenkschwellung

*Tabelle 3: Arthritisscoringsystem nach Nandakumar et al. 2003*



*Abbildung 4: Hinterpfoten zweier Versuchstiere 4 Wochen nach Induktion der CIA.  
Links: positiver Arthritisscore = 15 Punkten, Rechts = 0 Punkte*

## 2.5 Anästhesie und chirurgische Präparation

Vor jedem Versuch wurden die Mäuse auf den gesundheitlichen Zustand hin untersucht und das Körpergewicht ermittelt. Eine Wärmeplatte (37°C) sorgte während des gesamten Versuchsablauf für konstante Temperaturverhältnisse. Als Narkose erfolgte eine übliche Kleintieranästhesie mit Ketamin (Ketaminhydrochlorid, Ketamin® Betapharm GmbH & Co.KG, Vechta, Deutschland) und Xylazin (Xylazinhydrochlorid, Rompus®, Bayer Vital GmbH, Bayer Health Care, Deutschland). Alle Versuchstiere wurden vor der chirurgischen Präparation gründlich an beiden unteren Extremitäten enthaart. Die Pfoten wurde fixiert und mit einer Lagerungshilfe auf der Präparationsplatte in ca. 45° Knie- und Hüftflexion gelagert. Ein venöser Zugang in der linken Leiste wurde im proximalen Anteil der V. femoralis ca. 2mm distal des Leistenbandes positioniert. Die Präparation der synovialen Untersuchungsregion wurde am rechten Kniegelenk vorgenommen. Eine V-förmiger Schnitt öffnete die Cutis und ermöglichte die stumpfe Darstellung der Patellarsehne. Nach Durchtrennung der Sehne und kranialer Mobilisation der Patella lag der Hoffa´Fettkörper frei. Applikation von physiologischer Kochsalzlösung und Abdecken mit einem Deckgläschen verhinderte das Austrocknen des Gewebes.



Abbildung 5: Hoffa´Körperdarstellung mit V.femoralis-Katheter li.

## 2.6 Intravitalfluoreszenzmikroskopie und Bildverarbeitung

Die intravitale Mikroskopie ermöglicht nach Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen die quantitative mikrozirkulatorische In-vivo Analyse des Synovialgewebes ohne größeres Gelenktrauma. Unter Verwendung von Rhodamin 6G (Firma Merk, Darmstadt) und FITC-Dextran können die rheologischen Parameter als auch das mikrozirkulatorische Verhalten in den dargestellten Kapillaren und postkapillaren Venolen aufgezeichnet und beurteilt werden. Zur Erhebung der intravitalmikroskopischen Daten wurde ein hochauflösendes Zeiss-Axiotech-Stereomikroskop mit Auflichteinrichtung verwendet (Zeiss, Jena Deutschland). Die Epi-Illuminations-Mikroskopie beinhaltet eine 100W-Quecksilberlampe, adaptiert an ein Blau-(510-560nm/>505nm) und einer Grün-(510-560nm/>575nm) Filtersystem. Zum übersichtlichen Auffinden fand ein Objektiv mit vierfach Vergrößerung (Numerische Apertur (NA) 0.12) Verwendung. Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurden pro Tier vier repräsentative Gesichtsfelder mit einem x40-Wasserimmersions-Objektiv (NA 0.75; Zeiss) aufgezeichnet. Die Dokumentationen von 3 - 4 postkapillaren Venolen erfolgte mit Verwendung eines x20 Objektivs (NA 0.32; Zeiss). Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in einer festgelegten Reihenfolge i.v. appliziert. Gekoppelt an hochmolekulares Dextran (Molekulargewicht 150.000 D) zur Verhinderung einer Extravasation ist zunächst zweiprozentiges Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC) in einer Konzentration von 15mg/kg Körpergewicht verabreicht worden, das zur Kontrastierung des Gefäßnetzes durch Markierung des Blutplasmas diente. FITC-Dextran zeichnet sich durch ein Exzitationsmaximum zwischen 465-495 nm und ein Emissionsmaximum bei > 505 nm aus. Danach erfolgte die Applikation von zweiprozentigem Rhodamin 6G, ebenso intravenös. Rhodamin 6G dient in vivo der spezifischen Darstellung von Leukozyten, wobei der Farbstoff sowohl an das leukozytäre, aber auch an das thrombozytäre Cytochrom C bindet. Die Färbung mit Rhodamin ermöglicht die Beurteilung der leukozytären Fließdynamik und die Aktivierung sowie Interaktion mit dem Endothel postkapillärer Venolen im synovialen Gewebe. Dieser Farbstoff zeichnet sich aus durch ein Exzitationsmaximum um 535 nm, das Emissionsmaximum liegt bei >575 nm (Batz, et al., 1995; Jbeily et al., 2014). Er wird in einer Konzentration von 0,15 mg/kg KG injiziert. Die Bildaufnahme erfolgte durch eine integrierte, hochempfindliche CCD-(charge-coupled-device)-Videokamera (FK 6990-IQ-S, Pieper, Schwerte, Deutschland) und die Datenspeicherung mittels S-VHS-Videosystem auf Videokassetten. Dadurch konnte die Bildauswertung im Anschluss an die Präparation und Mikroskopie der Synovialis zeitlich und räumlich



getrennt als sog. Off-line-Analyse erfolgen. Der Analyse-Computer ist mit dem Programm CaplImage (CaplImage v7.4, Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgestattet, welches als Standardprogramm in der Bildanalyse der Mikrozirkulation gilt und u.a. die Bestimmung der funktionellen Kapillardichte, sowie der leukozytären Kinetik zulässt (Zeintl, et al., 1989; Harris et al., 1997; Schmitt-Sody et al., 2005). Die zu untersuchenden Dateien wurden dabei von einem Videorekorder eingelesen.

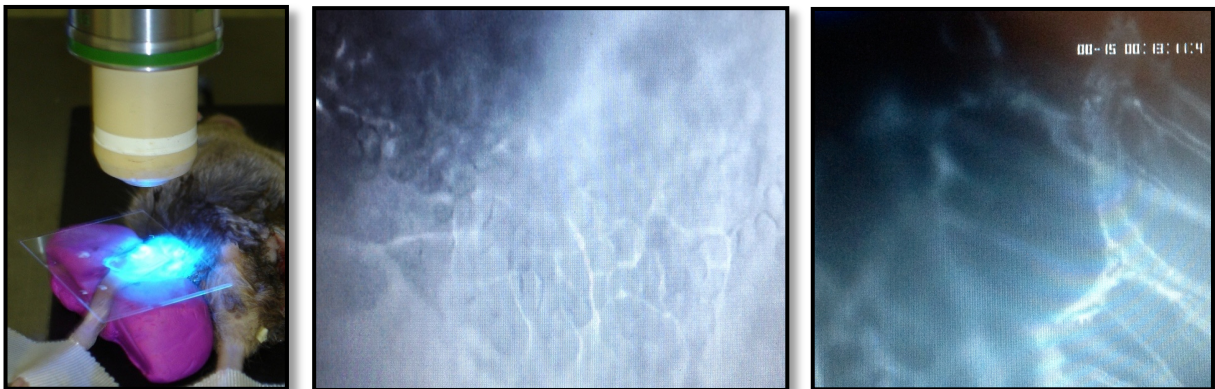


Abbildung 6: Mikroskopieraufbau (links), Übersichtsaufnahme einer postkapillare Venolen (Mitte) und Kapillarnetz (rechts).

Folgende mikrozirkulatorische Parameter wurden quantitativ erfasst:

1. Die funktionelle Kapillardichte (FCD,  $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) wurde mit Hilfe des FITC-Filters erfasst, welcher das zu untersuchende Gebiet blau belichtet (Gabe von 0,1 - 0,2 ml des zweiprozentigem FITC-Dextran). Die Funktionelle Kapillardichte, definiert als die Gesamtlänge der pro Gesichtsfeld von Erythrozyten durchflossenen Kapillaren, wurde bei 40-facher Vergrößerung erfasst. Dabei sind mind. 5 Gesichtsfelder des Synovialgewebes langsam von oberflächlichen in tiefere Schichten durchfokussiert worden.
2. Die Blutzellfließgeschwindigkeit (V-RBC) erfolgte mittels der computerassistierten Line-Shift-Methode (Klyscz et al. 1997).
3. Die Erfassung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen erfolgte unter Nutzung des grünilluminierenden G2A-Filters und der Gabe von 0,3 - 0,5 ml zweiprozentigem Rhodamin 6G. Beurteilt wurde die Interaktion zwischen Leukozyten und der Gefäßwand. Hierzu ist das Strömungsverhalten der Leukozyten unterschieden worden

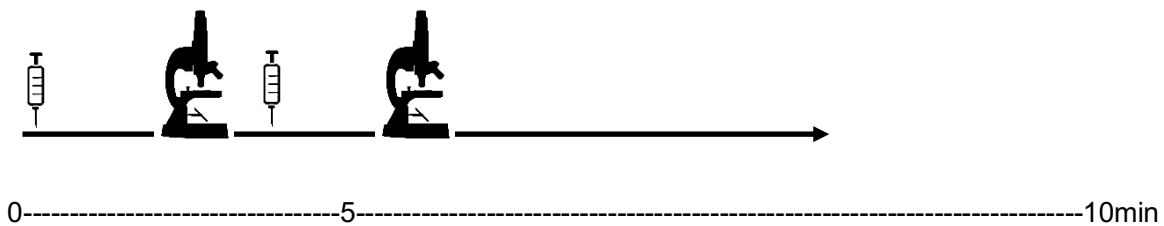


in fließend, rollend oder adhärent. Rollende Leukozyten wurden definitionsgemäß beschrieben als sich an der Gefäßwand entlang bewegend mit einer Geschwindigkeit von weniger als 40% jener Leukozyten in der Mittellinie der postkapillären Venole. Festsitzende Leukozyten wurden wiederum als über den Beobachtungszeitraum hinweg an der Venolenwand haftende, sich nicht bewegende Zellen definiert. Es wurden 3-4 venöse Gefäße über 30 sec beobachtet und bei 20-facher Vergrößerung auf das Video aufgenommen. Die Länge des Venolenabschnittes lag zwischen 100-200µm. Die Anzahl permanent anhaftender Leukozyten pro mm<sup>2</sup> Endothelzelloberfläche wurde dann anhand der ermittelten Anzahl der sich über den Zeitraum bewegungslos darstellenden Leukozyten, der Länge des betrachteten Gefäßabschnittes und des Venolendurchmessers errechnet.

#### Injektionsabfolge:

FITC-Dextran i.v.

Rhodamin 6G i.v.



## 2.7 Statistische Methoden

Die intravitalmikroskopisch ermittelten Ergebnisse wurden auf Normalverteilung geprüft und anschließend mit dem Students t-test miteinander verglichen. Bei Nichtnormalverteilung wurde der Man Whitney Rank Sum Test angewandt.

Zur weiteren Datenverarbeitung wurden die Daten im Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Deutschland) eingegeben und aufgearbeitet. Die statistischen Analysen erfolgten mit SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, Kalifornien, USA).

Alle ermittelten Untersuchungsergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde Ergebnissen ab einem p-Wert von  $<0,05$  (\*) unterstellt. Das Programm Excel diente zur Erstellung der graphischen Darstellung der Ergebnisse.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Arthritisscore

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Entzündungsausprägung zwischen der CCR3-Antikörper Serie mit der Kontroll-Gruppe. Tendenziell neigten bei den DBA/1J-Tieren die Tiere der CCR3-Antikörpergruppe zu einer geringeren Entzündungsreaktion. Eine Signifikanz ist dabei nicht abgebildet. Bei den B10.Q-Tieren prägte sich weder bei den CD44 -/- noch bei den CD44 +/+ kompetenten Tieren sichtbare Gelenkentzündungen aus.

### 3.2 Funktionelle kapillare Dichte

Bei beiden Mausstämmen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der quantitativen Ausbildung der funktionellen kapillaren Funktion. Die Dichte lag bei den CCR3-AK Tieren im Mittelwert bei  $75 \pm 3,36 \text{ cm/cm}^2$ , in der Kontrollgruppe bei  $95 \pm 6,44 \text{ cm/cm}^2$ .

Bei den B10.Q Tieren lag die Dichte im Mittel in der CD44-/- Gruppe bei  $87 \pm 3,3 \text{ cm/cm}^2$  und bei den CD44+/+ Tieren lag sie bei  $78 \pm 2,94 \text{ cm/cm}^2$ .

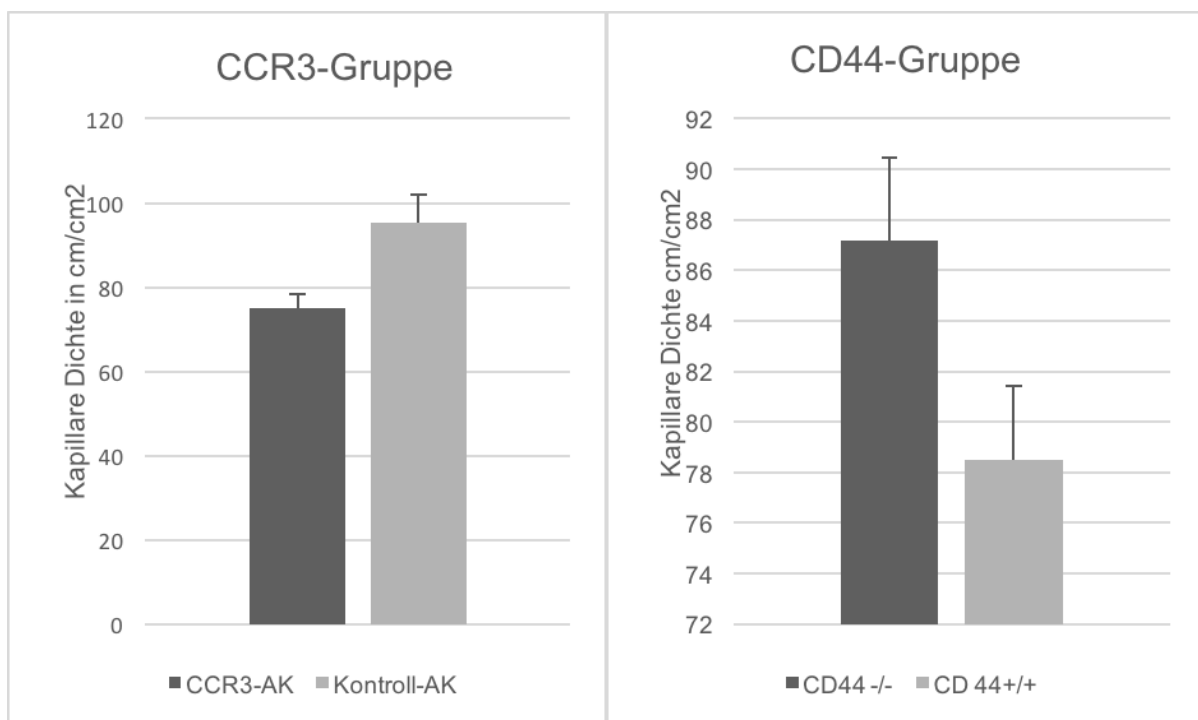


Abbildung 7: Funktionelle kapillare Dichte (FCD) in  $\text{cm/cm}^2$  angegeben. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert und SEM. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.3 Blutflussgeschwindigkeit

Für die Erythrozytengeschwindigkeit (mm/s) ergab sich in keiner der beiden untersuchten Gruppen ein signifikanter Unterschied. Beim CCR3-AK-exponierten Mausstamm DBA/1J besteht mit im Mittel von 0,31 mm/s eine Tendenz für eine höhere Strömungsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Kontroll-AK-exponierten Tieren mit im Mittel von 0,44 mm/s.

Im Vergleich der Strömungsgeschwindigkeiten zwischen den CD44 +/+ und CD44 -/- Mäusen besteht eine Tendenz zur höheren Blutflussgeschwindigkeit für die CD44 inkompetenten Tiere mit 0,52 mm/s versus 0,42 mm/s bei den CD44 kompetenten Mäusen.

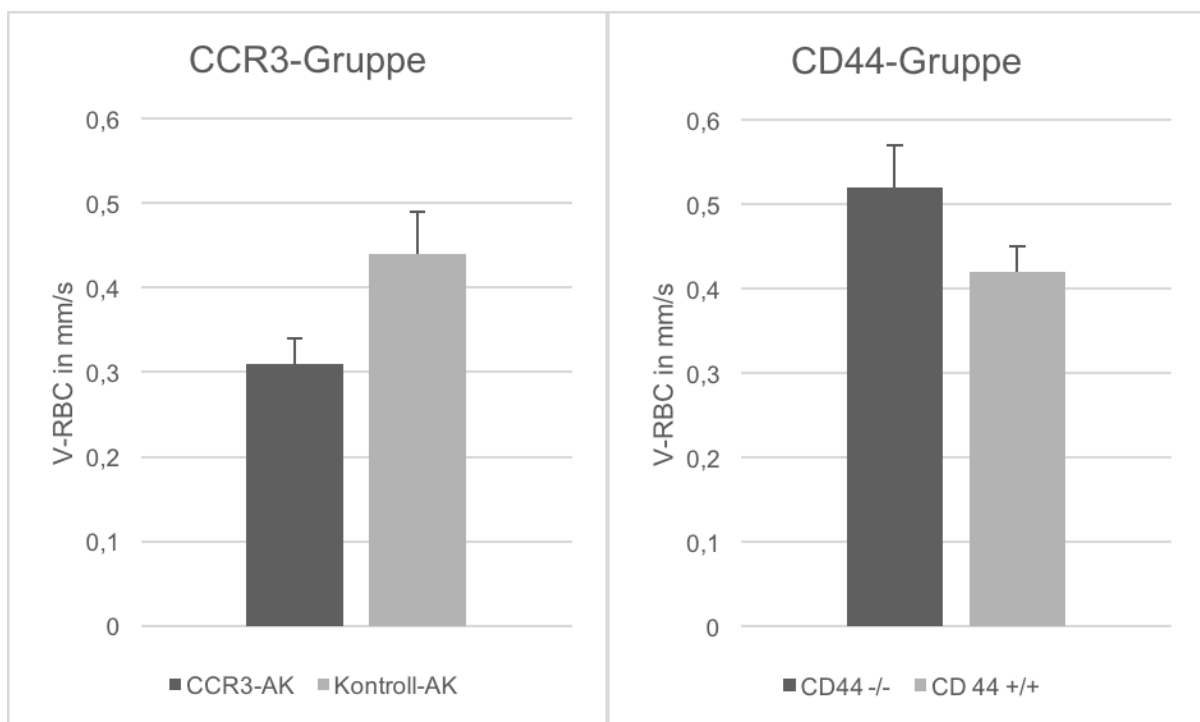


Abbildung 8: Erythrozytengeschwindigkeit (V-RBC) in mm/s angegeben. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert und SEM. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.4 Venolenoberfläche

Im Mittel lagen die endothelialen Oberflächen beim DBA/1J Stamm in der CCR3-AK-Gruppe bei 0,014 mm<sup>2</sup> und beim Kontroll-AK bei 0,015 mm<sup>2</sup> ( $p > 0,05$ ).

Die Venolenoberfläche bei den B10.Q Mäusen differierte zwischen CD44<sup>+/+</sup> mit 0,015 mm<sup>2</sup> und CD44<sup>-/-</sup> 0,015 mm<sup>2</sup> nicht.

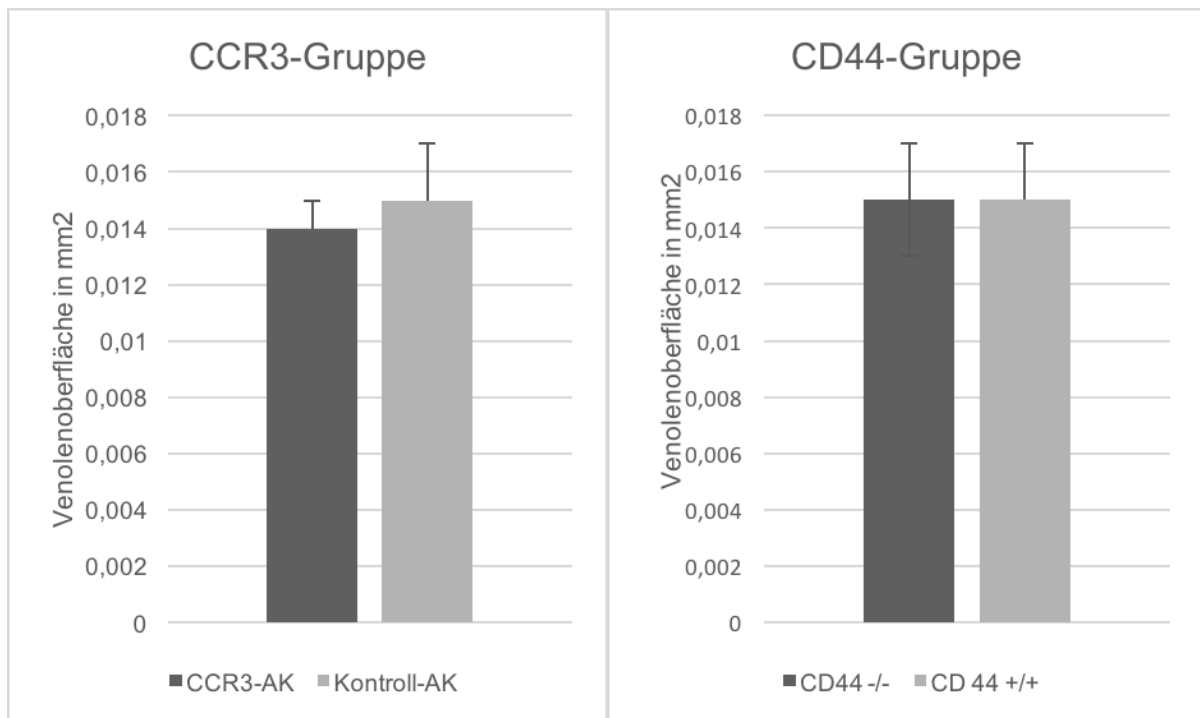


Abbildung 9: Postkapillare Venolenoberfläche in mm<sup>2</sup> angegeben. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert und SEM. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.5 Leukozytenflux

Der Leukozytenflux ist die absolute Anzahl passierender Leukozyten in der Beobachtungsvenole in der auch die weiteren Interaktionen dokumentiert wurden. Dabei wurden alle Leukozyten registriert, die in 30s das Gefäß durchquerten, unabhängig von ihrem Interaktionsverhalten. Die absolute Anzahl von passierenden Leukozyten fiel bei den mit CCR3-AK behandelten Tieren im Mittel von  $42 \pm 5/30s$  Leukozyten geringer aus als in der Gruppe mit dem Kontroll-AK mit  $48 \pm 4/30s$  Leukozyten. Eine Signifikanz konnte hierfür nicht nachgewiesen werden.

Die B10.Q-Serie wies einen signifikanten Unterschied in der Leukozytenpassage auf. Es passierten bei den CD44<sup>+/+</sup>-Tieren  $34 \pm 3$  Leukozyten in 30s gegenüber den CD44<sup>-/-</sup>-Tieren  $21 \pm 2$  in 30s.

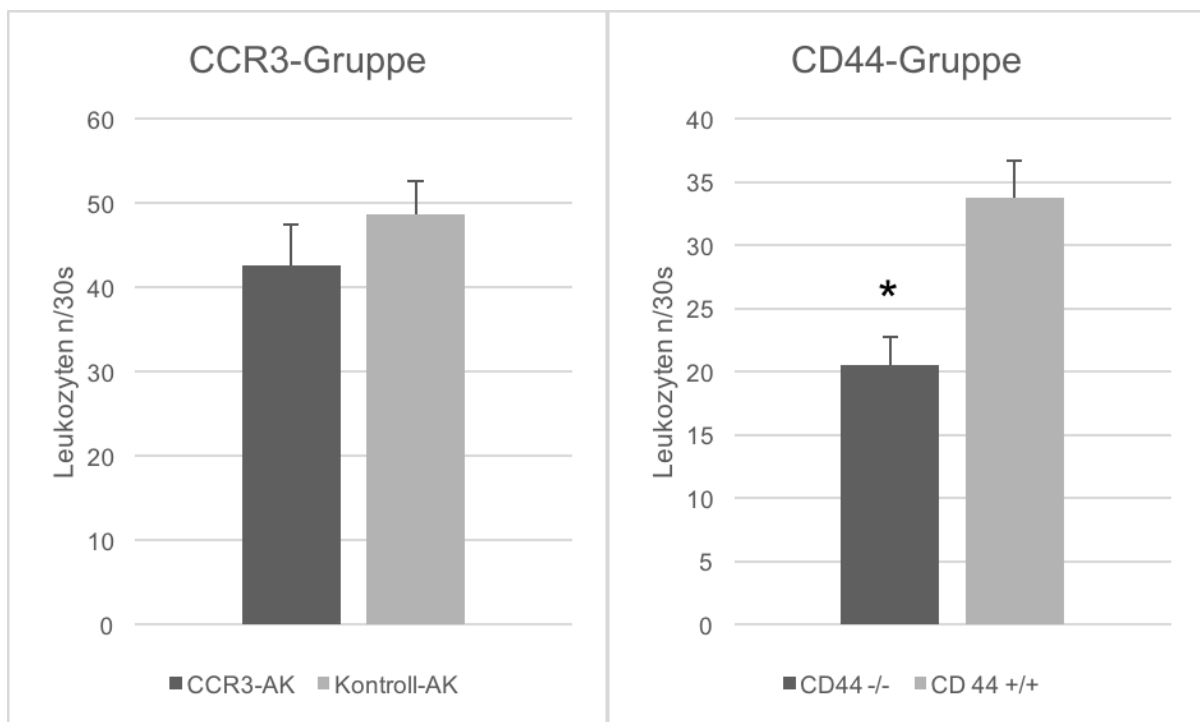


Abbildung 10: Absolute Anzahl von passierenden Leukozyten/Leukozytenflux in n/30s angegeben. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert und SEM. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.5.1 Rollende Leukozyten

In der DBA/1J-Serie ergaben sich signifikante Ergebnisse für die absolute Anzahl rollender Leukozyten. CCR3-AK-behandelte Tiere wiesen im Mittel  $12,67 \pm 4,85/30s$  rollende Leukozyten gegenüber  $18,06 \pm 5,80/30s$  bei der Kontroll-AK Gruppe auf. Das bedeutet eine Senkung um ca. 1/3 von rollenden Leukozyten in der CCR3-AK Therapie.

In der B10.Q-Serie stellte sich ebenfalls ein signifikantes Ergebnis dar. Für CD44-/- Tiere kam es zu  $2,67 \pm 1/30s$  rollenden Leukozyten gegenüber  $12,80 \pm 6,29/30s$  bei den CD44+/+Tieren. In der Knockout-Gruppe reduziert sich die Anzahl der rollenden Leukozyten um das ca. fünf- bis sechsfache.

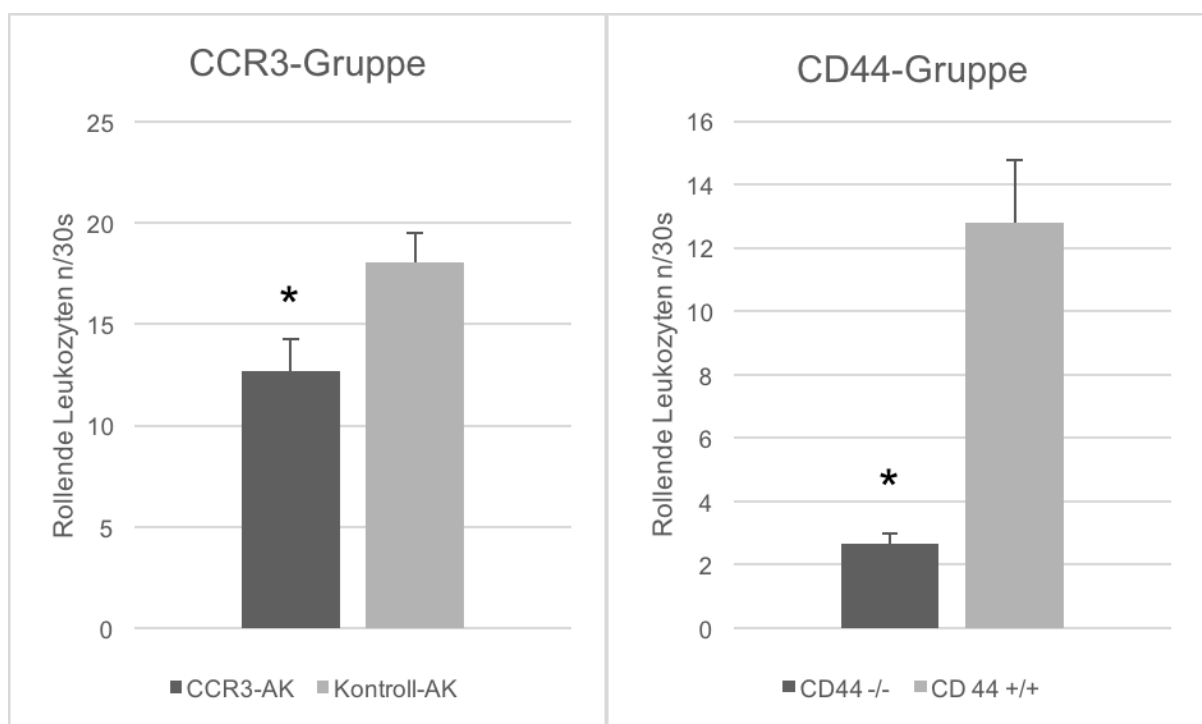


Abbildung 11: Absolutanzahl rollender Leukozyten in n/30s angegeben. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert und SEM. (\*  $p < 0,05$ )

### 3.5.2 Fraktion rollender Leukozyten

Die Fraktion rollender Leukozyten stellt den Anteil des gesamten Leukozytenflux dar, der eine lockere Adhärenz mit dem Endothel eingeht. Nach der Therapie mit CCR3-AK kommt es im Mittel zu einem signifikant geringeren Anteil von rollenden Leukozyten mit  $29,47 \pm 3,91$  % im Vergleich zu  $37,71 \pm 5,96$  % zur Kontroll-AK Gruppe.

Bei den B10.Q Mäusen zeichnete sich ein signifikanter Effekt zugunsten der CD44<sup>-/-</sup> Tiere ab. Die Fraktion der rollenden Leukozyten fiel im Mittel bei der Knockout Gruppe mit  $13,08 \pm 4,14$  % gegenüber den CD44<sup>+/+</sup> Tieren mit  $37,05 \pm 9,73$  % um >20 % geringer aus.

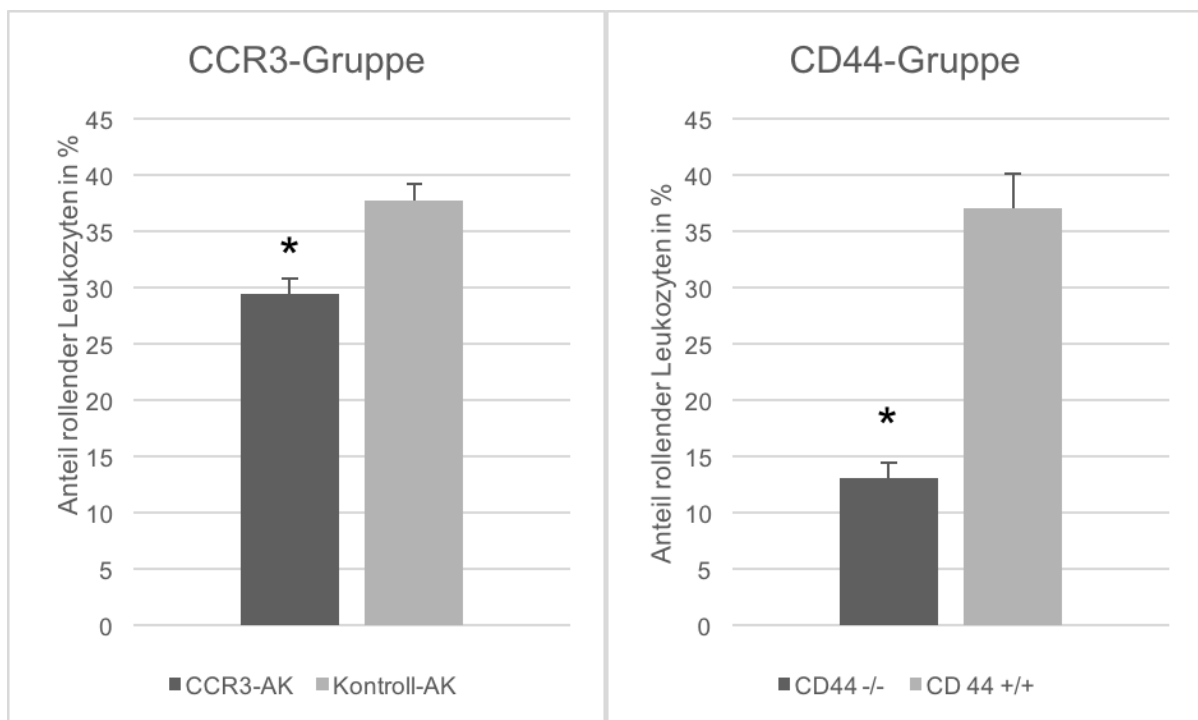


Abbildung 12: Fraktion rollender Leukozyten in % vom gesamten Leukozytenflux. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert und SEM. (\*  $p < 0,05$ )



### 3.6 Absolutanzahl adhärenter Leukozyten

Bei der Absolutanzahl permanent anheftender Leukozyten im Beobachtungszeitraum von 30s lag ein signifikanter Unterschied vor. In der CCR3-AK Gruppe adhärten  $8,33 \pm 3,24$  Leukozyten und bei der Kontroll-AK Gruppe  $15,50 \pm 6,35$  Leukozyten fest am Endothel.

Für die B10.Q-Serie stellte sich ebenfalls ein signifikantes Ergebnis dar. In der CD44 -/- Gruppe hafteten  $2,44 \pm 1,01$  Leukozyten bei den CD44 +/+  $10,00 \pm 4,37$  Leukozyten fest an der Venolenoberfläche an.

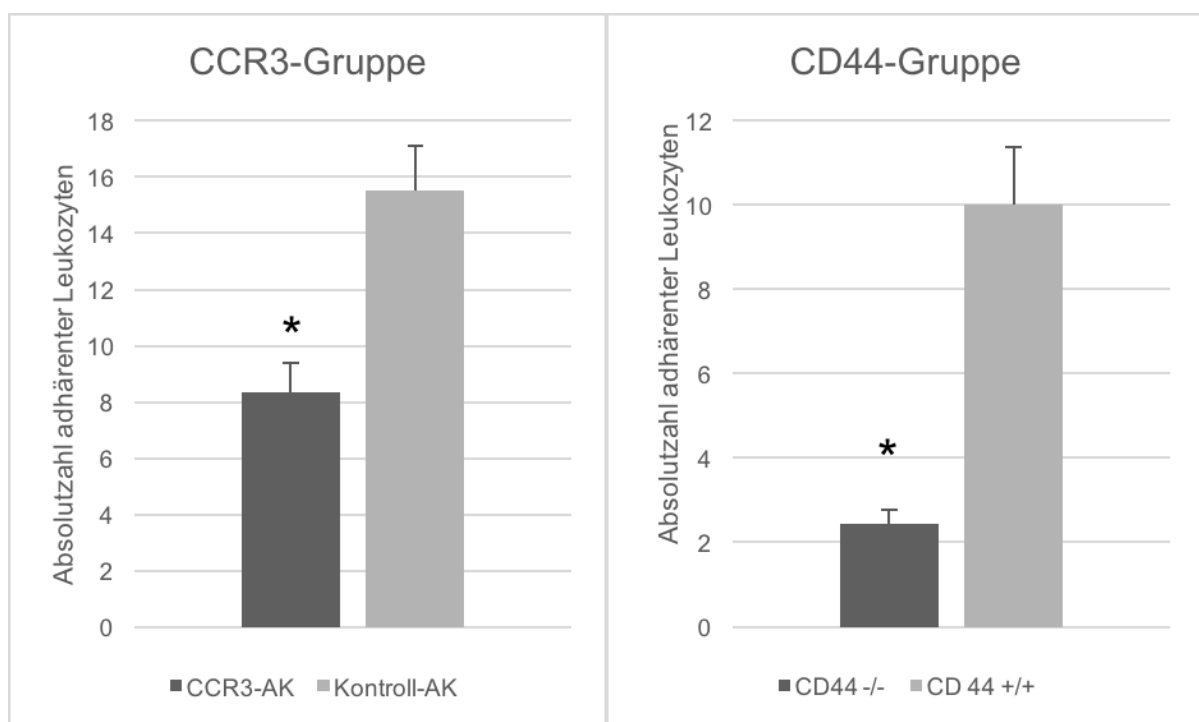


Abbildung 13: Absolutanzahl adhärenter Leukozyten in einem Beobachtungszeitraum von 30s in der postkapillaren synovialen Venole. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert und SEM. (\*  $p < 0,05$ )

### Anzahl adhärenter Leukozyten/mm<sup>2</sup>

Die Anzahl adhärenter Leukozyten je Venolenoberfläche stellte für die DBA/1J-Serie signifikante Zellzahlen dar. In der mit CCR3-AK behandelten Gruppe lag sie im Mittel bei  $608,11 \pm 129,73$  n/mm<sup>2</sup>, bei der Kontroll-AK lag die Leukozytenzahl bei  $1044,81 \pm 240,78$  n/mm<sup>2</sup>.

Im zweiten Versuchsbereich der B10.Q-Serie, stellten sich ebenfalls signifikante Werte dar. So zeigte sich bei den CD44<sup>-/-</sup>-Tieren gegenüber den CD44<sup>+/+</sup>-Tieren eine Leukozytenzahl von  $164,23 \pm 42,17$  vs.  $686,25 \pm 102,57$  n/mm<sup>2</sup>.

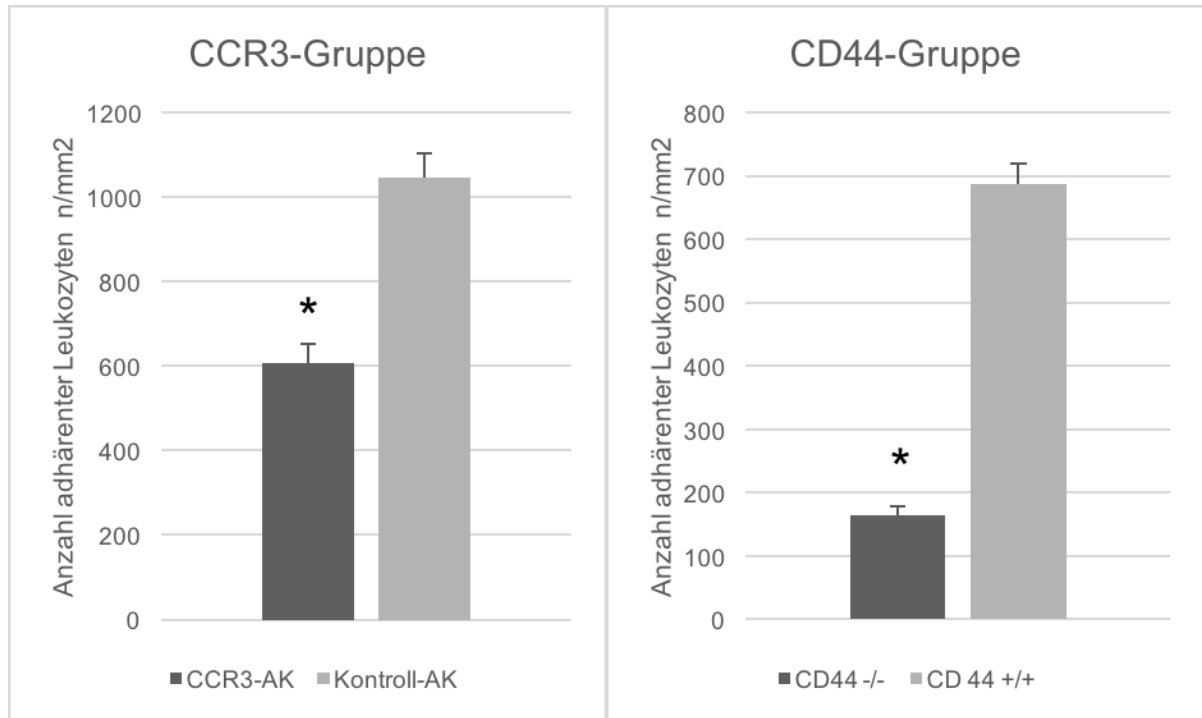


Abbildung 14: Anzahl adhärenter Leukozyten in n/mm<sup>2</sup> angegeben. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert und SEM. (\*  $p < 0,05$ )

## 4 Diskussion

Die Voraussetzung einer effektiven Infektionsabwehr und Heilung von Verletzungen ist unter anderem eine permanente Zirkulation und Gewebemigration von Leukozyten im Organismus. Die Leukozyten bewegen sich auf der Suche nach fremden Antigenen mit dem Blutstrom durch den Körper, dabei verlassen sie über die Diapedese die Gefäße, durchwandern Gewebe und kehren über das lymphatische System zum Teil wieder in den Blutkreislauf zurück (Liew et al., 2002). Bei einem Antigenkontakt verändert sich dieser Kreislauf. Kommt es zu einer Signaländerung an der Endotheloberfläche über gefäßaktive Prostaglandine, Prostacycline, Adhäsionsmoleküle und Chemokine hin zu Entzündung oder Infektion, verlassen u.a. die Granulozyten und Monozyten das Gefäßsystem (Smolen et al., 2012). Dieser inflammatorische Stimulus bestimmt den Beginn einer komplexen Kaskade mit Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Ein Netzwerk aus Zytokinen, Oberflächenmarkern und direkten Zell-Zell-Kontakten steuert die Zusammenarbeit der beteiligten Leukozyten (Vestweber et al., 2014). Aktivierende und bremsende Elemente sollen für eine adäquate und ggf. regional begrenzte Reaktion des Immunsystems sorgen. Ebenso wichtig wie die Ausprägung der Immunantwort ist die Festlegung der genauen Ziele. Kommt es zu einer Überreaktion, spricht man von einer überschießenden Immunantwort, wie es bei Allergien vorkommt. Ist diese Immunreaktion gegen den eigenen Körper gerichtet, so entsteht eine Autoimmunität. Primär ist die Autoimmunität nicht als pathologisch zu sehen. Auch im nicht erkrankten Organismus kommt es zur Bildung von B-Zellen, T-Zellen und Antikörpern, die gegen das eigene Gewebe gerichtet sind. Fehlen die nötigen Co-Stimulationen, entwickelt sich keine Entzündungsreaktion. Kommt es zu einem Versagen der körpereigenen Toleranz, so entwickelt sich eine Autoimmunerkrankung.

Die Inzidenz dieser Erkrankungen liegt bei ca. 4%. Dem rheumatischen Formenkreis, insbesondere der rheumatischen Arthritis, werden hierbei ca. 1-2 % zugeschrieben. Unterteilt man das Immunsystem in den unspezifischen Schenkel und den spezifischen Schenkel und geht davon aus, dass an diesem Punkt die aktive zelluläre Immunantwort beginnt, so sind zunächst die unspezifischen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen aktiv. Sie können nicht zwischen körpereigenen und körperfremden Zell-Oberflächen differenzieren. Durch die Produktion von Interleukinen wie IL-1, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, IL-12 und IL-18 werden weitere Komponenten

des Immunsystems integriert und andere Zellen wie das lokale Endothel aktiviert. IL-1 und TNF- $\alpha$  werden entscheidende Eigenschaften im Rahmen von Autoimmunerkrankungen zugeordnet. Zu den Eigenschaften gehören die Verstärkung der Antigenpräsentation und die Bildung eines Bindeglieds zwischen unspezifischer und spezifischer Immunantwort. Die regulatorischen Eigenschaften von TNF- $\alpha$  zeigen sich auch in der weiteren Stimulation der Interleukinbildung wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8. Als lokalen Effekt wird die vermehrte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM) stimuliert, dies wirkt wie ein Leuchtf Feuer zur Rekrutierung weitere immunkompetenter Zellen. Auch ortsständige Fibroblasten und Chondrozyten werden aktiviert. Feldmann et al. stellten die zentrale übergeordnete Position von TNF- $\alpha$  dar. Eine Applikation von anti- TNF- $\alpha$  in Zellkulturen aus rheumatoiden Gelenken reduzierte die Konzentration anderer in der Kaskade nachfolgender pro-inflammatorischer Interleukin wie IL-1, GM-CSF, IL-6 und IL-8. Die Rückkopplung durch Blockierung mit IL-1-Rezeptorantagonisten konnte die TNF- $\alpha$  Konzentration nicht reduzieren, wohl jedoch IL-6 und IL-8. Das lässt den stufenartigen Ablauf der pro-inflammatorischen Kaskade bestätigen. Bei der RA ist die Regulation der Inflammation hin zur Stimulation verschoben. Eben dieses Ungleichgewicht führt bei persistierendem Bestehen zur Gewebedestruktion im Arthritisgelenk. Die o.g. Zytokine stimulieren die Konzentrationserhöhung von knorpelzersetzenden Enzymen (MacNaul et. al., 1990). Durch TEM von Leukozyten nimmt das Synovium an Volumen und Aktivität zu und wird zum sog. RA-typischen Pannusgewebe. Dies bedeutet jedoch nicht, dass es keine antiinflammatorischen Komponenten gibt. Unter anderem können IL-1 Rezeptorantagonisten und lösliche TNF-Rezeptorantagonisten vermehrt in rheumatischen Gelenken nachgewiesen werden (Feldmann et. al., 1996). Genau an diesem Ungleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen setzt die etablierte Therapie mit Biologika wie TNF- $\alpha$ - und IL-1-Antagonisten an (z.B. Adalimumab oder Anakinra). Die Wirksamkeit ist gut, jedoch erreichen auch mit IL-1-Antagonisten nur ca. 14 Prozent eine vollständige Remission (Karanikolas et al., 2008). Durch die Therapie mit TNF- $\alpha$ -Antagonisten können 20-40 Prozent der Betroffenen keine komplette Remission erreichen oder erleben einen zunehmenden Wirkverlust (Rubbert-Roth A. et al., 2009). Diese Wirksamkeitslücke, die alle bisherigen Therapieformen mehr oder weniger gemeinsam haben, stellt die hohe Anzahl von beteiligten Strukturen insbesondere dar. In dieser Lücke könnte ein Immunglobulintherapieansatz greifen. Anti-citrullinierte Protein-Antikörper werden bei etwa 90% der RA-Patienten nachgewiesen und sind sicher an der Pathogenese der

Krankheit beteiligt (Uysal et al., 2009). APCA erwiesen sich als pathogen und gegen synoviale citrullinierte Proteine gerichtet und spielen eine signifikante Rolle in der Pathogenese der RA. Es gibt erfolgreiche invitro und invivo Behandlungen mit Anti-ACPA-Immunglobulinen (Svetlicky et al., 2015). Sie blockieren die Aktivität der pathogenen Autoantikörper. Die intravenöse Immunglobulintherapie (IVIg) hat sich bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten als vorteilhaft erwiesen. IVIg hat eine therapeutische Wirkung bei RA in menschlichen und tierischen Modellen, wie zum Beispiel Kollagen-induzierte Arthritis. Der Mechanismus, durch den IVIg das Immunnetzwerk bei RA immunmoduliert, wurde jedoch nicht vollständig geklärt. Bei Injektion in Mäuse mit CIA führte ACPA-sIVIg zu einem signifikanten Rückgang der klinische Gelenkentzündungswert. Die Behandlung mit ACPA-sIVIg bewirkte zu einem Rückgang der zirkulierenden Anti-Kollagen- und ACPA-Antikörper. Darüber hinaus korrelierten die verringerten Spiegel von Autoantikörpern mit erhöhten Spiegeln von entzündungshemmenden Zytokinen IL-10, TGF- $\beta$  und eine Abnahme der Sekretion von proinflammatorischen Spiegeln von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in vitro. Daher ist dieser Ansatz vielversprechend insbesondere als Alternative oder Ergänzung für jene Patienten, die nicht oder nicht mehr auf Therapien ansprechen (Svetlicky et al., 2015). Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich Patienten herauskristalisieren deren Immunsystem nicht ausreichend auf die Behandlung anspricht. So ist es von Bedeutung weitere Targets zu ermitteln. Gierer et al. haben bei DBA/1J mit CIA das Genexpressionsprofil für Adhäsionsmoleküle und proinflammatorische Mediatoren untersucht und festgestellt, dass u.a. die Expression der Gene für CD44 in Lymphknoten und Synovialzellen hochreguliert wurde. In der gleichen Arbeitsgruppe bestätigten Huang Tu-Rapp et al. die Ergebnisse für CD44, dabei stellte sich jedoch auch der zuvor nicht abgebildete Rezeptor CCR3 in den Fokus. Die Beteiligung von CCR3 am inflammatorischen Geschehen der RA ist wenig untersucht. Über die Verbindung zwischen den T-Zellen und CCR3 an ihrer Oberfläche ist kaum etwas bekannt. Histologisch und funktionell ist die Beteiligung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eindeutig (Firestein et al., 2003). Fehlen den Mäusen die  $\alpha/\beta$ -T-Zellen, sind sie gegen die CIA resistent (Cirthy et al., 1999). Naive CD4-T-Zellen bilden nach Antigenkontakt IL-2, welches zur Proliferation und Ausprägung von TH<sub>0</sub>-Zellen führt. Aus diesen Vorläuferzellen lassen sich zwei Subtypen anhand ihres Zytokin-Profiles differenzieren. Sie sind an unterschiedlichen Formen der Immunantwort beteiligt. Zum einen entstehen unter Mitwirkung von IL-12 und IL-18 die TH<sub>1</sub>-Zellen. Durch die

Synthese von IL-2, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) beeinflussen sie am ehesten die zelluläre Immunantwort. TH<sub>2</sub>-Zellen differenzieren sich unter der Stimulation von IL-4 und IL-10. Die wichtigsten gebildeten Zytokine sind IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13. Funktionell induzieren die TH<sub>2</sub>-Zellen eher eine humorale sowie eine IgE-vermittelte allergische Immunantwort (Bonecchi et al., 1998; Koch et al., 2005). Untersuchungen von Sallusto und Bonecchi zeigen, dass CCR3 auf humanen TH<sub>2</sub>-Zellen vorhanden ist (Sallusto et al. 1997). Auch Gerber et al. bestätigen einen hohen Anteil von CCR3<sup>+</sup>-T-Zellen bei Untersuchungen zu allergenspezifischen Reaktionen von TH<sub>2</sub>-Zellen. Die Identifizierung von T-Helfer (TH) 17-Zellen führte zur Spaltung der Zweiteilung der TH<sub>1</sub>-/ TH<sub>2</sub>-Achse bei der Immunpathogenese von Autoimmunkrankheiten wie RA und ihrem experimentellen Modell, der Kollagen-induzierten Arthritis. TH17-Zellen produzieren ein Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen, einschließlich IL-17, IL-6, IL-21, IL-22 und TNF- $\alpha$ . TH17-Zellen sind eine dominante pathogene zelluläre Komponente der RA. Obwohl die Bedeutung von TH17-Zellen in Tiermodellen für Arthritis unbestritten ist, gibt es nur begrenzte Daten zur Rolle von TH17-Zellen und verwandten Zytokinen bei menschlichen arthritischen Erkrankungen. Die Eigenschaften menschlicher TH17-Zellen nicht vollständig definiert. In Bezug auf die weitreichende Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch TH17-Zellen wird erwartet, dass TH17-Zellen ein potenter pathogener Faktor in der Immunpathophysiologie der Erkrankung sein könnten (Azizi et al. 2013). Über Interaktionen von TH17-Zellen und Eotaxin mittels CCR3 ist nichts bekannt. Das Vorhandensein von Eotaxin auf TH17-Zellen ist in der Literatur nicht dokumentiert, daher ist die Wirkung von CCR3-Antikörpern auf TH17-Zellen unwahrscheinlich. Eotaxine sind als selektiver CCR3-Agonist bekannt. Sie bewirken unter anderem eine lokale Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten. Untersuchungen von Kitayma et al. demonstrieren die Wirksamkeit der CCR3-Blockierung durch eine monoclonale Antikörpergabe. Die Bindungen von aktivierten eosinophilen Granulozyten am Venolenendothel konnte signifikant reduziert werden (Kitayama et al., 1998). Ähnliches zeige auch die Arbeit von Senechal et al., in der die Gewebemigration von eosinophilen Granulozyten durch CCR3-Antikörper unterdrückt werden konnte (Senechal et al., 2002). Dies demonstriert den Einfluss vom CCR3 auf die zelluläre Inflammation.

## 4.1 Diskussion der Methode

Induktion von Erkrankungen bei Tieren ist seit Jahrzehnten ein adäquates Mittel, um die Pathogenese und das Ansprechen von Therapien im größeren Umfang zu erforschen. Hierbei können viele Einflussfaktoren herausgearbeitet und ausgeschlossen werden. So unterliegen alle beteiligten Tiere nahezu den identischen äußeren Einflüssen. Um auch die genetischen Parameter zu minimieren, sind alle beteiligten Tiere von gleichem genetischem Ursprung. So lassen sich gezielt einzelne Parameter isoliert oder auch kombiniert variieren und die Auswirkung auf die Organismen der Versuchstiere untersuchen. Im Hinblick auf die rheumatoide Arthritis bestehen diverse Schwierigkeiten in der Erforschung des Krankheitsbildes, dabei stehen prinzipiell unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen ist dies die klinische Forschung am Patienten mit individuell gewonnenen Parametern, Gewebeproben, klinischen Scores und subjektiven Angaben, zum anderen die in-vitro-Forschung, welche organische Vorgänge außerhalb eines lebenden Organismus untersucht. Eine Übertragbarkeit dieser aus dem Gesamtkomplex herausgelösten Ergebnisse ist nur sehr eingeschränkt möglich, so dass die Forschung am lebenden Organismus die sog. *in vivo* Forschung unabdingbar ist. Wie eingangs beschrieben, müssen die zu erforschenden Erkrankungen auf ein möglichst kleines Maß an Parametern heruntergebrochen werden. Die von außerhalb wirkenden Mechanismen müssen möglichst ausgeschaltet oder für die beteiligten Lebewesen identisch sein. Aus ethischen, logistischen und auch rechtlichen Gründen ist die Forschung am Menschen nicht möglich. Letztlich verbleibt nur die Verwendung von etablierten Tiermodellen. Eine identische Abbildung der humanen Erkrankung einer RA ist auch hiermit nicht möglich. Die Maus bietet jedoch ideale Voraussetzung hinsichtlich der *in vivo* Erforschung als Modell der RA. Sie ist einfach zu halten, schnell zu vermehren und genetisch-immunologisch gut untersucht (Blake et al., 2017). Zum Erzeugen einer Arthritis stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Ziel ist es, mit möglichst geringstem Aufwand ein nahezu identisches Abbild zur humanen RA zu erzeugen.

## 4.2 Kollagen induzierte Arthritis

In dieser Studie wurde in der Frühphase einer CIA mittels hochauflösender intravitale Multifluoreszenz-Mikroskopie die zelluläre Entzündungsreaktion am venösen Endothel untersucht sowie der Einfluss von CCR3 und CD44 auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion *in vivo* dargestellt. Als geeignetes Beobachtungsareal stellt sich das Kniegelenk der Maus dar. Der intraartikulär gelegene Hoffa-Fettkörper eignet sich durch seine gute Zugänglichkeit für die intravitale Mikroskopie.

Um eine Arthritis zu etablieren, stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Das früher häufig genutzte Modell der Antigen induzierten Arthritis (AIA) wurde 1962 an Kaninchen entwickelt und wird seitdem genutzt. Auch für andere Kleinsäuger wurde dieses Verfahren verwendet. Das Mausmodell wurde durch Brackertz et al. erstmals beschrieben (Brackertz et al., 1977). Auch Großtiere wie Schafe fanden bereits Verwendung (Highton et al., 1997). Die Arthritis wird durch die subkutane Injektion von in CFA gelöstem Antigen induziert. Hunneyball et al. beschrieben eine mögliche Verstärkung der Reaktion dadurch, dass gleichzeitig eine intraperitoneale Injektion mit avitalen *Bordetella pertussis* erfolgte (Hunneyball et al., 1986). Eine Wiederholung der Antigeninjektion nach 7 Tagen bewirkt die Boosterung des Krankheitsverlaufs. Anschließend erfolgt nach weiteren 14 Tagen eine intraartikuläre Injektion mit dem bereits zuvor verwendeten Versuchsantigen. In diesem Gelenk, z.B. dem Kniegelenk, entwickelt sich die stärkste Form der Arthritis, ähnlich wie bei einem akuten Schub bei der RA (Dumonde et al., 1962). Zügig nach der Injektion kommt es zur Ausprägung einer Monarthritis. Die intraartikuläre Pathologie beginnt schon wenige Stunden nach der Applikation mit elektronenmikroskopisch sichtbaren Knorpelläsionen (Henzgen et al., 1996).

Das für die RA typische Pannusgewebe entwickelt sich auch bei der AIA durch T-Zell-vermittelte Infiltration von Leukozyten und durch die Proliferation von Synovialschleimhaut. Den Nachweis zur T-Zell-Beteiligung brachten Brackertz et al. dadurch, dass indem bei genetisch bedingter CD4<sup>+</sup> T-Zellendepletion nur eine verzögerte und schwächere Arthritis induziert werden konnte. Die humorale Reaktion war schwächer, konnte jedoch durch eine Boosterung gesteigert werden. Die intraartikuläre Pathologie bestand jedoch nur sehr dezent. Der T-Zelltransfer von Arthritismäusen löste jedoch auch bei depletierten Tieren die typischen histologischen Veränderungen aus. Daraus kann geschlossen werden, dass die AIA hochgradig



durch T-Zellen vermittelt wird (Brackertz et al., 1977). Die für eine RA typische synoviale Follikelbildung bleibt jedoch in diesem Modell aus (Wagner et al., 1998). Der Vorteil der AIA ist das hochgradige Ansprechen auf die Induktion der Arthritis bei fast allen Mausstämmen durch die Umgehung des MHC II Komplexes.

Der Nachteil dieser Methode liegt bei der Auslösung einer Monoarthritis. Aufgrund der unterschiedlichen klinischen und pathogenomischen Charakteristika im Vergleich zur humanen RA ergeben sich Bedenken bezüglich der klinischen Relevanz und Übertragbarkeit der AIA (Wooley et al., 2004; Hegen et al., 2008).

Ein weiteres Modell ist die Adjuvanz-induzierte-Arthritis, ein altes Modell. Es wurde primär als Rattenmodell durch Pearson im Jahr 1956 etabliert. Nach subkutaner Gabe von CFA kam es bei empfindlichen Ratten zu periarthritischen Inflammationen. Durch die Hinzunahme von Mycobacterium-tuberculosis-Bestandteilen kam es dann auch zur Ausprägung von rheumatoiden Pathologien (Pearson et al., 1956). An der Ausbildung der Arthritis sind T-Zell-vermittelte Kreuzreaktionen, Hitze-Schock-Proteine/HSP 65 (van Eden et al., 1988) und Proteoglykane (Holmdahl et al., 1989) beteiligt. 10-45 Tage nach der Induktion entsteht eine Form der akuten Arthritis, die im weiteren Verlauf wieder abklingt. Dieses Modell war die Grundlage zur Entwicklung der CIA durch Trentham et al. und ist heute aufgrund der geringen Übertragbarkeit auf die humane Verlaufsform nicht mehr üblich.

Das häufig genutzte Tiermodell der Maus zur RA ist die Kollagen-induzierte Arthritis. Es ist seit mehreren Jahrzehnten ein intensiv studiertes Tiermodell, das sowohl immunologische, pathologische und genetische Merkmale mit der humanen RA teilt (Ho et al., 1986; Holmdahl et al., 1990). Das Modell ist in genetisch empfänglichen Mausstämmen reproduzierbar und wird bei Maus- oder Rattenstämmen durch Immunisierung mit bovinem Kollagen Typ II Complete oder incomplete Freund's adjuvans induziert (Holmdahl et al., 1989).

Neben dem in dieser Studie Anwendung findenden Modell der CIA kommen weitere teilweise etablierte Methoden zum Einsatz. Zum Beispiel ist dies die Bakterienzellwand-induzierte-Arthritis, bei der es nach intraperitonealer Injektion von Streptokokkenzellwandbestandteilen zu einer milderen Ausprägung einer systemischen Arthritis kommt (Cromartie et al., 1977). Sie ist der RA sehr ähnlich. Soll eine höhere Inflammation erzielt werden, so muss eine erneute intraartikuläre Applikation durchgeführt werden. Diese triggert die lokale T-Zellenreaktion (Schwab et al., 1993). Weiter steht beim Mausstamm K/BxN die Entwicklung einer spontanen

Arthritis oder Transgene Arthritis als Modell zur Diskussion. In diesem Modell entsteht die Arthritis spontan bei Mäusen mit einer Dysregulation in der TNF- $\alpha$ -Expression in den Synovialzellen (Keffer et al., 1991). Der verwendete Mausstamm K/BxN ist eine Verbindung von KRN-Tieren mit verändertem TCR und NOD (non obese diabetes)-Mäusen. Sie bilden Autoantikörper, die sich gegen die Glukose-6-Phosphat-Isomerase richten und eine rheumatoide Inflammation auslösen (Kouskoff et al., 1996). Transferiert man das Serum aus diesen Tieren, wird eine Arthritis nach 10-15 Tagen in Gang gesetzt (Christensen et al. 2016). Hierbei handelt es sich um eine aufwändige und kostenintensive Methode, was letztlich insgesamt für die Nutzung der CIA als Methode der Wahl spricht. Sie zeichnet sich durch eine hohe Übereinstimmung mit dem klinischen und histologischen Krankheitsbild der RA aus (Trentham et al. 1982). Es entwickeln sich erste Schwellungen und Rötungen der kleinen Vorfußgelenke, gefolgt von den Hinterpfoten, mit progredienten Funktionseinschränkungen bis hin zu Gelenkdeformitäten. Inflammatorische Gelenkveränderungen dominieren in den distalen Sprung-, Tarsal- und Interphalangealgelenken. Diese Tatsache geht mit der RA konform, die ebenfalls bevorzugt die kleinen Hand- und Fußgelenke befällt. Die mikrozirkulatorischen Effekte nach systemischer Antigenapplikation sind auf andere Untersuchungsregionen übertragbar, wobei sich womöglich in klinisch manifest betroffenen Gelenken die entzündlich bedingten Veränderungen der Mikrozirkulation noch deutlicher abzeichnen könnten. Die Gelenkhistologie der CIA entspricht der RA in Form der Zellinfiltration in das Synovialgewebe, Bildung von Pannusgewebe und Zerstörung von Knorpel- und Knochenmatrix (Trentham et al., 1977). Die Ausbildung von mikroskopisch sichtbaren Lymphfollikeln und rheumatypischen Granulomen bleibt aus (McNamee et al., 2015).

Für das Modell der CIA sind insbesondere die Mausstämme DBA/1J, B10.Q geeignet. Bei ihnen liegt eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für das Ansprechen auf die Arthritisausprägung nach Immunisierung mit Kollagen II (CII) in CFA (Kannan et al., 2005). Typischerweise wird Rinder-/bovines Kollagen Typ II verwendet. Wird eine schnellere und ausgeprägtere Autoimmunreaktion gewünscht, kann nach 3 Wochen zusätzliche eine Boosterung der Arthritis mit CII mit Incomplete Freund's adjuvans erfolgen (Hegen et al., 2008). Üblicher Weise beginnen 3-5 Wochen nach der Immunisierung bei der CIA die ersten klinischen Zeichen der Arthritis, das Maximum wird nach ca. 6 Wochen erreicht (Asquith et al., 2009). Die im Vorfeld ablaufenden initialen Schritte der zellulären Inflammation am Endothel sind nicht erfasst. Aufgrund dessen steht in dieser Studie der Fokus auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion zu

einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung ohne Boosterung. Eine Nachimmunisierung kann insbesondere dann verstärkend einbezogen werden, wenn das Ziel ist einen möglichst starken klinischen und histologischen Effekt zu erzielen. Möglicherweise könnte man den Effekt auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion auch noch deutlicher herausarbeiten.

Wie auch bei der humanen RA ist die Empfänglichkeit für die CIA eng mit der Expression von Klasse-II-MHC-Allelen verknüpft (Wooley et al., 1981; Brunsberg et al., 1994). Im Allgemeinen ist das Ansprechen verbunden mit den MHC Klassen II I-A<sup>q</sup>, I-A<sup>r</sup> und -H2<sup>q</sup>, daher kommt es bei anderen Mausstämmen als bei DBA/1J und B10.Q zu einer divergierenden Arthritisausprägung im Rahmen der CIA, so dass diese Mausstämme weniger geeignet sind (Asquith et al., 2009). Nach der Immunisierung kommt es bei der CIA zur Induktionsphase. Dabei ist die Arthritisentwicklung abhängig von der Stimulation der T-Zellpopulation und der Steigerung der spezifischen Autoantikörperproduktion. Dies betrifft vor allem die IgG2a-Produktion gegen CII durch B-Zellen (Rosloniec et al., 2010; Watson et al., 1985). Das ist ein Vorteil zu anderen Modellen der RA, bei denen T-Zellen und B-Zellen primäre nicht beteiligt sind, z.B. bei der AIA oder K/BxN-Modell (Korganow et al., 1999). Autoreaktive T-Zellen, die gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, erkennen Kollagen mittels zellständigem MHC und stimulieren B-Zellen zur Bildung von Antikörpern. Diese sorgen durch Immunkomplexe für ein Aktivieren des Komplementsystems sowie ortsständiger Zellen und beschleunigen somit den Entzündungsprozess. Die Pathologie der CIA wird durch das komplexe Zusammenspiel von zellulären und humoralen Immunmechanismen bestimmt (van Lent et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass der klassische und der alternative Pathway des Komplementsystems verwendet werden. Die Faktoren C5a und C5aR sind zusätzliche Schlüsselfaktoren in der Pathogenese vom CIA-Modell (Andersson et al., 2014). An der Steuerung der Inflammation sind eine Vielzahl von aktivierenden und bremsenden Zytokinen beteiligt. Zu nennen sind TNF, IL- $\beta$ , G-CSF, GM-CSF, IL-6 und IL17 als aktivierende Zytokine und IL-4 als bremsendes Zytokin. In den Zytokinmustern unterscheiden sich die verschiedenen Arthritismodelle. So spielen beim K/BxN Modell TNF und GM-CSF nur teilweise eine Rolle und IL-6 und IL-4 sind überhaupt nicht beteiligt (Christensen et al., 2016). Ein Aspekt, der für das CIA-Modell spricht, ist das robuste, erfolgreich und relativ identische inflammatorische Ansprechen auf die Arthritisinduktion, jedoch lediglich bei den dafür empfänglichen Mausstämmen wie DBA/1, B10.Q, und

B10.QRIII (Christensen et al., 2016). Das Mausmodell der CIA ist als etabliertes Verfahren vielfach mikrozirkulatorisch und immunologisch sehr gut untersucht. Es eignet sich hervorragend für diese Studie am Kniegelenk. Durch die Nähe zur humanen RA bestehen ideale Bedingungen zur in-vivo-Darstellung von zellulären inflammatorischen Effekten und weitere mikrozirkulatorische Analysen tragen möglicherweise zur Wissenserweiterung bei. Die hohe Konkordanz des CIA-Modells und der RA hat es zur am häufigsten eingesetzten Methode am Mausmodell gemacht (Brand et al., 2003; Christensen et al., 2016). Die Tabelle 4 stellt die Übereinstimmungen zwischen der RA mit der CIA dar.

<b>Pathologie</b>	<b>Humane rheumatoide Arthritis</b>	<b>Mausmodell der CIA</b>
multiple Gelenkschwellungen	Typisches Bild	Ja, 21-28 Tage nach Immunisierung
Synovialitis	Typisches Bild	Ja, 10 Tage nach Krankheitsbeginn
Pannusgewebe	Typisches Bild mit Knorpeldestruktion	Ja, 7-10 Tage nach Krankheitsbeginn
Knochenerosionen	Typisches Bild	Ja, 10 Tage nach Krankheitsbeginn
Chronische Schmerzen	Individuell vorhanden	Ja, bei Krankheitsbeginn
Lungenfibrose	Möglich	Teilweise doch evtl. durch CFA
Kardiale Pathologie	Nicht typisch	Mitbeteiligung möglich
Konjunktivale Entzündungen/Augen	Nicht typisch	Konjunktivitis möglich
Citrullinierte Antikörper (CCP/ACPA)	>90% positiv	Ja, bei C57B1/6.Q Mäusen mgl.
Rheumafaktoren (RF)	>80% positiv	Ja, bei C57B1/6.Q Mäusen mgl.

*Tabelle 4: Pathologien der humanen RA und der CIA modifiziert (McNamee et al., 2015).*

### 4.3 Auflichtilluminationsfluoreszenzmikroskopie und chirurgische Präparation

Als Analyseverfahren für die Mikrozirkulation in Geweben stehen mehrere Techniken zur Verfügung. Man unterscheidet zwischen den „direkten“ und den „indirekten“ Verfahren. Indirekte Techniken sind die Mikrosphären-Technik (Vollmar et al., 1992; Anetzberger et al., 2003), die H<sub>2</sub>-Clearance-Technik (Day et al., 1989), die Laser-Doppler Flowmetrie (Cai et al., 2016), die Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs (Vollmar et al. 1992; Zhang et al., 2015), die Verwendung der Thermographie (Saumet et al., 1986; Nitzan et al., 1988) und Mikrokorrosionspräparationen (Forsman et al., 1992).

Das hier verwendete direkte Verfahren der IVM, ist ein bereits etabliertes Verfahren in der medizinisch-biologischen Forschung zur Echtzeitdarstellung von dynamischen mikrozirkulatorischen Abläufen, wie bei der Leukozyten-Endothel-Interaktion. Veihelmann et al. verwendeten die Methode erstmals erfolgreich, um nach einem Immunstimulus bei einer Arthritis die Mikrozirkulation charakterisieren zu können (Veihelmann et al., 1998, 1999). Insbesondere in der Frühphase der Arthritisinduktion stellt die Intravitalmikroskopie mit ihren heutigen Möglichkeiten eine ideale Methode zur mikrozirkulatorischen Analyse dar (Menger et al. 1999). Um dynamische zelluläre intravasale Abläufe darstellen zu können, ist die Zell- und Plasmamarkierung für die Intravitalmikroskopie nötig. Dabei verwendeten wir Rhodamin 6G als Fluoreszenzfarbstoff für die Leukozytenmarkierung und FITC-Dextran zur intravasalen Kontrastanhebung. Mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe und moderner Mikroskopiertechnik können verschiedene Abläufe zum Zelltod, Volumentransport, Plasmaextravasation, Endozytose und Diapedese beobachtet und untersucht werden (Dunn et al., 2002). Dabei ist die IVM nicht nur auf synoviale Regionen beschränkt. Auch andere Organsystem sind unter physiologischen und pathologischen Bedingungen intravital analysiert worden, z.B. das Herz (Tillmanns et al. 1993; Vollmar et al. 1995), das Gehirn (Villringer et al., 1989), die Leber (Vollmar et al., 1993/1996), sämtliche weiteren intra- und retroperitonealen Organe (u.a. Vollmar et al., 1994a) und Skelettmuskeln (Nolte et al., 1994; Menger et al., 1992a & b). Mittels Auflichtillumination konnten gezielte Untersuchungen zur Mikrozirkulation und deren zellulären Zusammenhängen bei Inflammationen, z.B. bei Transplantatabstoßungen und Autoimmunprozessen unternommen und die Therapie optimiert werden (Menger et al., 1993; Menger/Vollmar et al., 1996). Dabei werden die Farbstoffe intravasal injiziert und je nach ihren Eigenschaften in verschiedene Kompartimente verteilt. Die

limitierende Faktoren in der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen sind der phototoxische Effekt und die eigene Induktion von zellulären Reaktionen in Abhängigkeit von Einstrahlungsintensität und Dauer in ihrem Anregungsspektrum. Das betrifft FITC-Dextran ebenso wie Rhodamin (Saetzler et al., 2016). Daher ist ein längerer Untersuchungszeitraum von 20-30 s zusätzlich zum Darstellungsprozess nicht sinnvoll. Außerdem sollten im Verlauf nicht bereits belichtete oder nebeneinanderliegende Gesichtsfelder untersucht einschränken. Das würde die Menge an Beobachtungsarealen und die max. Untersuchungszeit ein. FITC-Dextran wird zur Darstellung der Perfusionsverhältnisse in der intravitalmikroskopischen Untersuchung intravenös appliziert, wodurch eine Gefäßkontrastierung erreicht werden soll. Da die verwendeten Farbstoffe in zu hoher Dosierung die Ergebnisse durchaus ungünstig beeinflussen, galt es darauf zu achten, während der mikroskopischen Aufnahmen, die Dosis möglichst gering zu halten, um z.B. Thrombosierung zu vermeiden (Steinbauer et al., 2000).

Die anschließende „Off-line“-Analyse des Videomaterials beinhaltet den Vorteil, die erhaltenen Ergebnisse unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit des einzelnen Versuchstiers und dem vorhergehenden experimentellen Ablauf objektiv auswerten zu können. Des Weiteren lassen sich die zu bestimmenden Mikrozirkulationsparameter auf der Grundlage des Programmes CapImage manuell und computergestützt sowohl quantitativ, als auch qualitativ untersuchen (Harris et al., 1997; Schmitt-Sody et al., 2005).

Das Kniegelenk der Maus ist für die Intravitalmikroskopie aufgrund seiner zugänglichen Strukturen ideal geeignet. Durch wenige mikrochirurgische Arbeitsschritte ist der Synovialgewebe freigelegt. Dabei bleiben die Gefäßstrukturen unangetastet. Das Volumen von ca. 1-2mm<sup>3</sup> ist gut lichtpermeabel und die vasalen Strukturen lassen sich zwischen Kapillaren, postkapillaren Venolen, Venen und Arterien besser differenzieren. Im Vergleich zum Fettgewebsvolumen am Kniegelenk der Ratte (6-8fach) sind die Mikroskopierbedingungen deutlich einfacher. Da jede chirurgische Intervention zu einer Aktivierung inflammatorischer Prozesse mit einer Steigerung der Mediatorausschüttung, der Gefäßpermeabilität sowie der Leukozytenadhärenz führen kann, wurde die zeitsparende chirurgische Intervention mit einer schnellen Fokussierung kombiniert (Kirveskari et al., 2003). Dadurch reduzierte sich der präparations- und darstellungsbedingte Einfluss der daher als eigener inflammatorischer Reiz unberücksichtigt bleiben kann.

Durch eine Ketamin-/Xylazinnarkose wird eine „dissoziative Anästhesie“ erreicht und es wird vermieden, dass eine stressbedingte Katecholamin- und Cortisol-Ausschüttung die Leukozyten-Endothel-Interaktion während der Mikroskopierphase beeinflusst. Schutzreflexe bleiben bei der Ketaminnarkose erhalten, während die vitalen Funktionen weitgehend unbeeinflusst sind (Carroll et al., 1996). Ein beeinflussender Faktor für die Hämodynamik ist die Verwendung von Xylazin als Sedativum, ein  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-Agonist. Er wirkt außerdem als Analgetikum und Muskelrelaxans. Es ist bekannt, dass diese Substanzen nicht nur zentralnervös wirken, sondern zunächst an den peripheren  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren wirken und reflektorische Schwankungen des Herzminuten-Volumens auslösen. Daher kann es in der Narkose u.a. zu Bradykardien und atrio-ventrikulären-Überleitungsstörungen (Wright et al., 1982; Alef et al., 2003) oder einer Reduktion der Ventrikel-Kontraktion kommen (Benson et al., 1990; Löscher et al., 2006). Die Kombination mit Ketamin fängt diese Effekte größtenteils ab. Der relevanteste zentralnervöse Wirkort für Ketamin befindet sich am Glutamat-NMDA-Rezeptorkomplex. Ketamin ist ein schlafferzeugendes Hypnotikum und auch ein potentes Analgetikum, dass die Reflextätigkeit erhält. Weiterhin wirkt Ketamin hemmend auf die periphere Wiederaufnahme von Noradrenalin und Dopamin an der synaptischen Endplatte mit Verstärkung endogener und exogener Katecholamineffekte. Durch diese Mechanismen kommt es zu einer ausgeprägten Stimulation des Herz-Kreislauf-Systems (Hevers et al., 2008; Fachinformation Ketamin, 2015). Neben kardialen, analgetischen, hypnotischen und psychogenen Effekten kommt es zu Bronchodilatation und somit zur Stabilisierung der Narkose. So entfällt die bei anderen Anästhetika bestehende Gefahr eines lebensbedrohenden Atemstillstands und damit die Notwendigkeit einer Atem- und Kreislaufüberwachung. Periphere vasoaktive Prozesse, Einflüsse auf die zelluläre Inflammation oder eine Veränderung in der Leukozyten-Endothel-Interaktion werden in der Literatur für Ketamin nicht beschrieben. Daher ist diese Kombination von Narkose und Darstellungstechnik ideal für diese Form des Kleinterversuchs geeignet. Die intravitale Mikroskopie ist als „direkte Technik“ anderen Verfahren, welche nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation ermöglichen, überlegen. Die Verbindung aus der Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes mit der CIA der Maus eignet sich hervorragend, um vorhandene Erkenntnisse zu den Arthritismodellen auszubauen und neue Aspekte zu Therapiestrategien und Pathogenese herauszuarbeiten.

#### 4.4 Diskussion der Ergebnisse

Die Pathologie und der Leidensdruck der rheumatoiden Arthritis sind durch Schmerzen, Schwellung, Rötung und Überwärmung geprägt. All dies sind Auswirkungen von inflammatorischen Prozessen, die lokal durch die Infiltration von Entzündungszellen verursacht werden. Im zellulären Zentrum der Inflammationsgenese stehen vor allem die Leukozyten. Kommt es in der Frühphase zur Aktivierung eben dieser zirkulierenden Zellen, so beginnt eine komplexe Kaskade von interzellulärer Interaktion und Kommunikation. Das bewirkt ein Verlassen des Intravasalraumes hin zu den noch unbemerkt erkrankten Gelenken. Voraussetzung dafür ist die Leukozytenadhäsionen in der Initialphase der CIA (Sehnert et al., 2006). Im weiteren Verlauf der Inflammation mit dem Übergang ins chronische Stadion nimmt die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wieder ab (Tu-Rapp et al., 2010; Veihelmann et al., 1999). Unter der Steuerung und Moderation dieser erstinfiltrierenden Leukozyten kommt es zum Ausbau der pathologischen Prozesse mit zunehmender Hyperplasie der intraartikulären Synovialzellen, so dass sich durch Anreicherung weiterer inflammatorischer Zellen und Zellreihen ein aggressives Pannusgewebe bildet. Durch lokale lytische Prozesse, Veränderung der Trophik und der synovialen Mikrozirkulation kommt zur Destruktion und zu einem zunehmenden Funktionsverlust des betroffenen Gelenks (Gearing et al., 1993). Um ein Abbild für die Frühphase der RA in der CIA zu erfassen und die Beeinflussung der Mikrozirkulation im peri- und intraartikulären Gewebe abzubilden, haben schon Veihelmann et al. sowie Schmidt-Sody et al. mit Hilfe der IVM die Leukozyten-Endothel-Interaktionen am Modell der Albumin-Induzierten Arthritis beschrieben (Schmitt-Sody et al., 2005; Veihelmann, et al., 1999). Angesichts eines entzündlichen Stimulus verlassen die Leukozyten vermehrt den zentralen Blutstrom, haften anfangs lose an der Gefäßendotheloberfläche und rollen über transient vermittelte Wechselwirkungen entlang der Wand (Butcher et al., 1991). Während des Aktivierungsstadiums beginnen beide Kontaktpartner, die Expression und/oder die Aktivität von Adhäsionsrezeptoren auf den Zelloberflächen zu steigern, bis es schließlich zu einer festen Adhäsion kommt (Cook-Mills et al., 2005). Letztlich können die Leukozyten den Intravasalraum durch TEM verlassen (Wittchen et al., 2005). Die lokale Produktion von Zytokinen durch Leukozyten, wie z.B.  $\text{TNF-}\alpha$ , führt zu einer weiteren Produktion von mehr Zytokinen sowie zu einer hochregulierten Expression von Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmolekülen wie ICAM und VCAM auf



deren Oberfläche. Die gesteigerte lokale Produktion und Präsentation spezifischer Chemokine bewirkt, dass die Leukozyten sich in der Umgebung des Inflammationsareals konzentrieren. Die Bindung dieser Chemokine an G-Proteingekoppelte Rezeptoren auf Leukozyten, wie sie auch bei CCR3 gegeben ist, führt vermutlich zu einer schnelleren Aktivierung der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrin-Aktivierung. Die feste Adhäsion wird durch die erhöhte Affinität der Leukozytenintegrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4),  $\alpha$ L $\beta$ 2 (LFA-2, CD11a/CD18) und  $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mac-1, CD11b/CD18) Adhäsionsmoleküle wie VCAM, ICAM gefördert (Wittchen et al., 2009). Diese komplexen Interaktionen sind Voraussetzung für die anschließende Diapedese in das subendotheliale Gewebe mit weiterer Wanderung in angrenzende Strukturen und vermutlich auch mit Modulation der inflammatorischen Signalkaskade. Als Bestandteil der endothelialen Interaktionen und subendothelialen Migrationen kann das Oberflächenantigen CD44 gesehen werden. Es kommt auf Endothelzellen, subendothelialen Matrixzellen und auf Leukozyten vor. Als Verbindungsglied zwischen zwei CD44-Rezeptoren auf den Zellen dient die Hyaluronsäure, die bei gelenknahen Inflammation vermutlich in höher Konzentration vorhanden ist (Pure et al., 2001).

In der vorliegenden Studie wurde intravitalmikroskopisch ein deutlicher Effekt auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion gezeigt. Es konnte die antiinflammatorische Wirkung durch CCR3-Blockierung am DBA/1J-Mausstamm ebenso aufgezeigt werden wie der Effekt einer reduzierten Leukozyten-Endothel-Interaktion beim CD44 Knockout am B10.Q-Stamm. Die Einschränkung der Ergebnisinterpretation ist das Fehlen der „gesunden“ nicht immunisierten Vergleichsgruppe, daher besteht die Limitation einer potenziellen Überinterpretation der Ergebnisse.

#### 4.4.1 CCR3 Blockierung - DBA/1J Stamm

Es ist bekannt, dass CCR3 mit zahlreichen entzündlichen Prozessen assoziiert ist. Bisher wurde CCR3 im Rahmen der RA wenig berücksichtigt. Tu-Rapp et al., detektierten, dass bei der CIA an DBA/1J das Genexpressionsniveau für CCR3 ansteigt und vermuteten eine Beteiligung am Pathomechanismus der RA.

Liu et al. wiesen für die RA nach, dass die CCR3-Expression im Synovialgewebe und auch im peripheren Blut auf Leukozyten gesteigert ist. Die Hauptpopulation für CCR3<sup>+</sup> Zellen im arthritischen Gelenk sind die Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten. Im peripheren Blut sind es vor allem CD14<sup>+</sup>Zellen (Monozyten, Makrophagen) und CD90<sup>+</sup>-(=Thy-1) Leukozyten, die eine hochregulierte Expression von CCR3 haben. CD90 ist an der Vermittlung durch mehrere Integrine und wahrscheinlich einige noch unbekannte andere Rezeptoren für die Adhäsion von Leukozyten und Monozyten an Endothelzellen beteiligt (Rege et al., 2006). Für CD8<sup>+</sup>/CCR3<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen kommt es zur reduzierten Expression bei der RA (Liu et al., 2017). Eotaxin-1, als Ligand von CCR3, verstärkt diesen Effekt durch zusätzliche Expression von CCR3. Eine verstärkte Bildung von CCR3 auf Synovialzellen und eine Konzentrationserhöhung von Eotaxin-1 im Plasma und in der Synovialflüssigkeit von RA deuten darauf hin, dass CCR3-vermittelte Mechanismen eine wichtige Rolle bei RA spielen (Liu et al., 2017).

Die Ergebnisse der DBA/1J-Serie in der Frühphase der CIA bestärken diesen Sachverhalt. Unsere Untersuchungen zeigen auf, dass die präventive Gabe von CCR3-Antikörpern, als dreimalige Dosis, eine signifikante Suppression der zellulären Inflammation für Leukozyten am synovialen Endothel im Vergleich zur Scheinbehandlung bewirkt. Der blockierende Effekt von CCR3-Antikörpern auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bezog sich sowohl auf die lockere Adhärenz, das sog. Rolling, als auch auf die nachfolgende Phase der permanenten Adhärenz. Die Störung der CCR3-Ligand-Interaktion durch die Blockierung eines seiner Partner könnte die Entwicklung einer arthritischen Entzündung vermeiden, auch wenn dieser Prozess bereits begonnen hat. Jedoch muss einschränkend dargestellt werden, dass der Effekt von CCR3-Antikörpern nicht mit einer gesunden Vergleichsgruppe, ohne Immunisierung, untersucht wurde. Es ist also nicht sicher zu sagen, ob die Blockierung von CCR3 auch bei nicht erkrankten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Endothel-Interaktion führt. Unterschiede bezüglich struktureller Parameter wie FCD, Venolenoberfläche oder Blutstromeigenschaften (V-RBC) konnten nicht

nachgewiesen werden. Eine Vielzahl von Chemokinen und Rezeptoren könnte eine wichtige Rolle bei verschiedenen entzündlichen Gelenkerkrankungen spielen. Obwohl auch andere Rezeptoren beteiligt sind, könnte die Migration von CCR3-Positiven Zellen in Richtung des Synovialkompartiments eine Rolle in der Effektorphase verschiedener Formen von Arthritis spielen. Die Beteiligung von CCR3 am Pathomechanismus von Asthma und Allergien scheint ebenso gesichert. Es sind bereits eine Reihe von Substanzen entwickelt worden um den Rezeptor selektiv im Gewebe und bei Leukozyten zu hemmen. Jedoch besitzen eine Vielzahl von Zellen die Fähigkeit, CCR3 zu exprimieren, und die Eotaxine wirken mit anderen Chemokinen an CCR3 zusammen (Erin et al., 2002). CCR3 ist eng in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eingebunden, und eine Blockade dieses Rezeptors bzw. der gesamten Eotaxin-Achse könnte ausgeprägte positive Effekte bei diesen Krankheiten haben (Abboud et al., 2015). Es ist anzunehmen, dass Anti-CCR3-Agenzien auch in therapeutischen Anwendungen für RA eine Rolle spielen könnten. Es ist zu erwarten, dass eine vollständige oder zu starke Blockierung der Eotaxin-CCR3-Achse auch zu unerwünschten Ereignissen führen kann, daher ist die Entwicklung von sog. Chemokin-Clearing-Molekülen ein attraktiver therapeutischer Ansatz, um pathologisch erhöhte Chemokin-Spiegel selektiv auf einen physiologischen Bereich senken (Abboud et al., 2015).

#### 4.4.2 CD44 Knockout - B10.Q Stamm

CD44 ist als ein Oberflächenantigen in einer Vielzahl von Isotypen bekannt. Die vielgestaltigen Strukturen von CD44 könnten die Ursache für die Multifunktionalität und die Fähigkeit sein, mit vielen Zelloberflächen und extrazellulären Liganden zu interagieren, wobei die wichtigste Struktur die Hyaluronsäure ist. Von den möglichen Funktionen des CD44 fokussiert sich dieser Versuchsaufbau auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion am synovialen Venolenendothel. Gierer et al. konnten in einem Arthritismodell zeigen, dass die Genexpression für CD44 gesteigert vorlag (Gierer et al., 2005). Was die Vermutung der Rolle für CD44 in diesem frühen Stadium der Arthritis unterstützte. In der Gelenkschleimhaut von Patienten mit RA konnten erhöhte Konzentrationen von CD44-Isoformen sowie deren Liganden, Hyaluronsäure nachgewiesen werden (Nedvetzki et al., 1999). Nedvetzki et al. erreichten durch Injektion von Anti-CD44-Antikörpern eine Reduktion der Inflammation bei CIA (Nedvetzki et al., 1999). In-vitro-Studien weisen darauf hin, dass CD44 ein wichtiger Bestandteil der RA-Manifestationen ist. Mehrere Publikationen zeigen den Rückgang von arthritischer Aktivität nach intravenöser Injektion von Anti-CD44-Antikörpern an DBA/1J- oder BALB/c-Mäusen bei CII- oder Proteoglycan-induzierter Arthritis. Die Beurteilungskriterien beschränken sich jedoch lediglich auf klinisch-histologische Einschätzungen (Mikecz et al., 1995; 1999; Verdrengh et al., 1995; Nedvetzki et al., 1999). Publikationen über B10.Q-CD44-Knockout-Versuche bei CIA in Kombination mit intravitaler Darstellung sind bisher nicht bekannt. Mikecz et al., nutzten ein Modell der CIA mit CD44-defizienten DBA/1-Mäusen und zeigten eine reduzierte arthritische Aktivität, sowohl in Bezug auf die Inzidenz als auch auf den Schweregrad. Für die zelluläre Inflammation bestand eine verzögerte Infiltration von CD44-defizienten Lymphozyten in das Gelenkgewebe. Sie interpretieren ihre Untersuchungsergebnisse dahingehend, dass CD44 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Arthritis spielt, indem er den Leukozytenverkehr auf den Ort der Entzündung richtet (Stoop et al., 2001, 2002). Das bestätigen auch unsere Daten in der Hinsicht, dass keines der B10.Q Knockout-Tiere klinische Arthritiszeichen aufwies und die Leukozyten-Endothel-Interaktion signifikant niedriger war als in den CD44 kompetenten Tieren. Einschränkung muss man jedoch erwähnen, dass auch CD44+/+ Mäuse keine klinischen Arthritiszeichen zeigten.

Der Aufbau und die Funktion des menschlichen CD44 ist dem der Maus ähnlich (Nedvetzki et al., 1999). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Erkenntnisse auf dem Menschen übertragen werden können und als potentielle therapeutische Methode dienen. Da das auslösende Antigen bisher nicht detektiert wurde, kann die primäre Phase der Krankheitsinitiierung nicht durch direkte Antigen-Targeting-Therapie oder gar kausal behandelt werden. Die von Takahashi, Kelleher und Brennan et al., beschriebene Differenz in der Expression oder in der Konzentration von CD44 bei peripheren Leukozyten und gelenkständigen Leukozyten bestärkt die These, dass die gesteigerte Expression von CD44 und das Vorhandensein von Hyaluronsäure in der Inflammationsregion eine Art „Filtereffekt“ für sensible aktive Leukozyten haben und eine weitere Verstärkung der lokalen Arthritis verursachen (Takahashi et al., 1992; Kelleher et al., 1995; Brennan et al., 1997). Wir konnten mit unseren Untersuchungen zeigen, dass das Oberflächenantigen CD44 einen wesentlichen Einfluss an der zellulären Inflammation am Synovialgewebe hat. So war die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beim Knockout von CD44 signifikant vermindert. Das ermöglicht einen tieferen Einblick in die zellvermittelte Inflammation in der Frühphase der RA in einem CIA Modell der Maus. Es muss jedoch limitierend aufgezeigt werden, dass ein Vergleich mit einer nicht immunisierten Versuchsgruppe nicht geführt wurde. Dies lässt die Argumentationen zu, dass auch ohne vorhanden sein einer CIA durch das Fehlen des CD44-Rezeptors eine geringere Endothelinteraktion vorhanden ist. In weiteren Untersuchungen muss daher nachgewiesen wie sich der CD44-Knockout-Effekt zum einen auf nicht immunisierte Mäuse auswirkt und zum anderen ob es Veränderungen der Wirkungsweisen bei CIA mit Boosterung und in Spätphasen kommt.

Wenn durch diese Untersuchungen bestätigt wird, dass die Leukozyten-Endothel-Interaktion und Migration von CD44 abhängig ist, kann dieses Oberflächenantigen als frühes Target in der therapeutischen Option betrachtet werden. Um eine weitere Spezifizierung der möglichen Therapie zu erreichen, wäre die Detektion der RA spezifischen Isoformen des CD44 von Vorteil. So bleiben unter selektiver Blockierung die gewollten physiologischen Funktionen bestehen.

## 5 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) wird bei etwa 1-2% der Bevölkerung diagnostiziert und ist damit die häufigste Autoimmunerkrankung. Das typische Manifestationsalter liegt zwischen dem 40.-60. Lebensjahr. Kommt es zu einer genetischen Prädisposition, so steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit um das 5-10fache an. Eine genaue Ursache ist bis heute nicht sicher bekannt. Unbehandelt verläuft die Erkrankung im allgemeinen chronisch-progredient, polyarthritisch gelenkzerstörend mit drohender frühen Arbeitsunfähigkeit und geht mit Erhöhung der Mortalität gegenüber der Normalbevölkerung einher. Durch Fortschritte in der Erforschung der Ätiologie und Pathogenese kam es zu einem Wandel der therapeutischen Optionen, weg von systemischer Immunsuppression hin zu differenzierten sog. Targeted-Therapiestrategien. Durch die Nutzung von zielgenauen monoclonalen Antikörpern auf der Ebene von Oberflächenantigenen, Interleukinen und Chemokinen konnten die Raten der Remissionen gesteigert und vorzeitige Gelenkdestruktionen zurückgedrängt werden. Ein besseres detailliertes Verständnis, insbesondere der Initiation der RA, ist Voraussetzung für die Entwicklung neuer effizienter Therapieansätze. Sicher ist, dass die Pathogenese der RA einer Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren unterliegt. Daher ist die Verwendung von Tiermodellen für die *in vivo* Diagnostik eine adäquate Methode. Beim Modell der CFA/Kollagen II induzierten Arthritis (CIA) wurde an zwei Kollagen-sensiblen Mausstämmen (DBA/1J und B10.Q) beiden Stämmen eine Autoimmunarthritis durch subkutane Injektion von 125µg bovinem Kollagen II in komplettem Freud'schem Adjuvans (CFA) induziert. Auf eine Nachimmunisierung wurde verzichtet. In der DBA/1J-Serie erhielten die Hälfte der Tiere am 21., 24. und 27. einen monoclonalen Antikörper (MAB1551; R&D Systems) gegen den CCR3 (CD193) und die übrigen Tiere einen Kontroll-AK. 4 Wochen nach Induktion, jedoch vor dem Einsetzen klinischer Krankheitszeichen, wurden die Tiere narkotisiert und die Synovia des Kniegelenks nach Durchtrennung der Patellarsehne für die Multifluoreszenz-Intravitalmikroskopie (IVM) exponiert. Anschließend erfolgte die *in vivo*-Mikroskopie unter bis 400-620-facher Vergrößerung in blauem bzw. grünem Licht bei i.v. Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran sowie Rhodamin-6G.

Im zweiten Studienteil der B10.Q-Serie wurde durch identisches Vorgehen eine Autoimmunarthritis induziert. Bei der Hälfte der Tiere bestand ein Knockout (-/-) für das

Oberflächenantigen CD44. CD44 ist ein leukozytärer Adhäsions-Rezeptor. Die IVM wurde ebenfalls 4 Wochen nach Arthritisinduktion durchgeführt.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von CCR3 und CD44 auf die zelluläre Entzündungsreaktion am synovialen Venolenendothel zu untersuchen und mittels hochauflösender Multifluoreszenz-Mikroskopie zu charakterisieren. Es konnte signifikant anhand der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion gezeigt werden, dass die subkutane Injektion von bovinem Kollagen II zu einer massiven Entzündungsreaktion in der Synovia des Kniegelenks bei den Kontrolltieren führte. Tiere, welche mit dem Antikörper (AK) gegen CCR3 vorbehandelt wurden, zeigten eine deutlich verringerte zelluläre Inflammation. Der Nachweis des CCR3-Antikörper-Effekt bei nicht immunisierten Tieren steht aus und begrenzt die Interpretationsweite der Ergebnisse. Die funktionelle Kapillardichte als Maß der nutritiven Perfusion zeigte keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Im zweiten Studienteil (B10.Q, CD44<sup>-/-</sup> gg. CD44<sup>+/+</sup>) bestand ebenfalls eine ausgeprägte zelluläre Entzündungsreaktion am synovialen Venolenendothel, wobei die Tiere mit dem CD44<sup>-/-</sup> eine signifikant geringe Rate von lockerer Leukozytenadhärenz (rollende Leukozyten/30s) und fester Leukozytenadhärenz (adhärente Leukozyten/mm<sup>2</sup>) aufwiesen. Auch hier besteht die o.g. Begrenzung der Ergebnisinterpretation durch das Fehlen der Vergleichsgruppen.

Wir konnten mit unseren Untersuchungen mit entsprechenden Einschränkungen zeigen, dass die Oberflächenantigene CD44 und CCR3 einen wesentlichen Einfluss an der zellulären Inflammation am Synovialgewebe haben könnten. Das ermöglicht einen tieferen Einblick in die zellvermittelte Inflammation in der Frühphase der RA in einem CIA-Modell der Maus. Aus der Arbeit könnte abgeleitet werden, dass die Reduktion der mikrovaskulären Leukozytenadhärenz mit Minimierung der folgenden transendothelialen Infiltration und Vermeidung der Inflammationskaskade durch die gezielte Adressierung von CCR3 und CD44 möglich ist. Durch Ausweitung der Versuchsgruppen in Folgeexperimenten wäre eine Untermauerung der Ergebnisse möglich. Das kann langfristig in Behandlungsmethoden von therapeutischer Bedeutung sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Abboud D., Daubeuf F., Do Q.T., Utard V., Villa P., Haiech J., Bonnet D., Hibert M., Bernard P., Galzi J.L., Frossard N., A strategy to discover decoy chemokine ligands with an anti-inflammatory activity. *Sci Rep.*, 2015 5: 14746.

Abdel-Nasser, A.M., J.J. Rasker, Vaikenburg H.A., Epidemiological and clinical aspects relating to the variability of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 1997 27(2): 123-140.

Amerio P., Frezzolini A., Feliciani C., Verdolini R., Teofoli P., De Pità O., Puddu P., Eotaxins and CCR3 receptor in inflammatory and allergic skin diseases: therapeutical implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2003 2(1): 81-94.

Anderson E.C., Hansen B.E., Jacobsen H., Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4-restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998 95: 7754-7955.

Andersson C., Wenander C.S., Usher P.A., Hebsgaard J.B., Sondergaard B.C., Rono B., Rapid-onset clinical and mechanistic effects of anti-C5aR treatment in the mouse collagen-induced arthritis model. *Clin Exp Immunol.*, 2014 177(1): 219–233.

Anetzberger H., Thein E., Becker M., Walli A.K., Messmer K., Validity of fluorescent microspheres method for bone blood flow measurement during intentional arterial hypotension. *J Appl Physiol.*, 2003 10: 1152.

Asquith D.L., Miller A.M., McInnes I.B., Liew F.Y., Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.*, 2009 39(8): 2040–2044.

Azizi G., Jadidi-Niaragh F., Mirshafiey, A., Th17 Cells in Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.*, 2013 16: 243-253.



Baatz H., Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp.*, 1995 15(2): 85-91.

Banerjee S., Webber C., Poole A.R., The induction of arthritis in mice by the cartilage proteoglycan aggrecan roles of CD4+ and CD8+ T cells. *Cell Immunol.*, 1992 144(2): 347-357.

Bendelac A., Savage P.B., Teyton L., The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*, 2007 25: 297-336.

Benson G.J., Thurmon JC., Intravenous anesthesia. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 1990 6: 513-528.

Blake J.A., Eppig J.T., Kadin J.A., Richardson J.E., Smith C.L., Bult C.J., The Mouse Genome Database Group. 2017. Mouse Genome Database (MGD)-2017: community knowledge resource for the laboratory mouse. *Nucl. Acids Res.*, 2017 Jan. 4: 723-729.

Bloemen P.G., van den Tweel M.C., Henricks P.A., Engels F., Wagenaar S.S., Rutten A.A., Nijkamp F.P., Expression and modulation of adhesion molecules on human bronchial epithelial cells. *Am J Respir. Cell Mol Biol.*, 1993 9: 586-593.

Bonecchi R., Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.*, 1998 187(1): 129-134.

Borland, G., J.A. Ross, and K. Guy, Forms and functions of CD44. *Immunology*, 1998 93(2): 139-148.

Brackertz D., Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J Immunol.*, 1977 20: 1639-1644.

Brackertz D., Mitchell G.F., Mackay I.R. Antigen-induced arthritis in mice. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum.*, 1977 118(5): 841-850.

Brand D.D., Kang A.H., Rosloniec E.F., Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol.*, 2003 25(1): 3-18.

Brunsberg U., Expression of a transgenic class II Ab gene confers susceptibility to collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol.*, 1994 24 (7): 1698-1702.

Butcher E.C., Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 1991 67: 1033-1036.

Cai Q., Xu G., Liu J.A., modification of intraluminal middle cerebral artery occlusion/reperfusion model for ischemic stroke with laser Doppler flowmetry guidance in mice. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2016 12: 2851-2858.

Carroll G.L., Hartsfield S.M. General anesthetic techniques in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 1996 12: 627-661.

Caspi D., Anouk M., Golan I. et al., Synovial fluid levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and IgA rheumatoid factor in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006 55: 53–6.

Christensen A.D., K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Frontiers in Immunology*, 2016 7: 213.

Collington S.J., The function of CCR3 on mouse bone marrow-derived mast cells in vitro. *Immunology*, 2010 121 (1): 115-124.

Cook-Mills J.M., Deem T.L., Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol.*, 2005 77 (4): 487-495.

Cope A.P., T cell responses to a human cartilage autoantigen in the context of rheumatoid arthritis-associated and nonassociated HLA-DR4 alleles. *Arthritis Rheum.*, 1999 42 (7): 1497-1507.

Corr M., Crain B., The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis. *J Immunol.*, 2002 169 (11): 6604-6609.

Coughlin S. R., Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb.Haemost.* 2001 86: 298-307.

Cromartie W.J., Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med.*, 1977 146 (6): 1585-602.

Dalchau R., Kirkley J., Fabre J.W., Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol.*, 1980 10 (10): 737-44.

Daugherty B.L., Springer M.S., The beta-chemokine receptor genes CCR1 (CMKBR1), CCR2 (CMKBR2), and CCR3 (CMKBR3) cluster within 285 kb on human chromosome 3p21. *Genomics*, 1997 41 (2): 294-5.

Day T.J., Lagerlund T.D., Low P.A., Analysis of H<sub>2</sub> clearance curves used to measure blood flow in rat sciatic nerve. *The Journal of Physiology*, 1989 414: 35-54.

DeGrendele H.C., Estess P., Siegelman M.H., Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science*, 1997 278: 672-675.

Dougados M., Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). *Ann Rheum Dis.*, 2014: 62-68.

Dumonde D.C., Glynn L.E., The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol.*, 1962 43: 373-383.

Dunn K.W., Sandoval R.M., Kelly K.J., Dagher P.C., Tanner G.A., Atkinson S.J., Bacallao R.L, Molitoris B.A., Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002 283: 905-916.

Ehnis T., A chondroitin/dermatan sulfate form of CD44 is a receptor for collagen XIV (undulin). *Exp Cell Res.*, 1996 229 (2): 388-397.

Erin E.M., Williams T.J., Barnes P.J., Hansel T.T., Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2002 1 (2): 201-214.

Feldmann M., Brennan F.M., Maini R., Cytokines in autoimmune disorders. *Int Rev Immunol.*, 1998 17 (1-4): 217-228.

Firestein G.S., Zvaifler N.J., How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum.*, 1990 33 (6): 768-773.

Firestein G.S., Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 2003 15: 356-361.

Forsman A.D., McCormack J.T., Microcorrosion casts of hamster luteal and follicular vasculature throughout the estrous cycle. *Anat Rec.*, 1992 233: 515-520.

Franklin E.C., An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med.*, 1957 105 (5): 425-438.

Fries J.F., The relative toxicity of alternative therapies for rheumatoid arthritis: implications for the therapeutic progression. *Semin Arthritis Rheum.*, 1993 23 (2): 68-73.

Fujinami R.S., Sequence homology and immunologic cross-reactivity of human cytomegalovirus with HLA-DR beta chain: a means for graft rejection and immunosuppression. *J Virol.*, 1988 62 (1): 100-105.

Gal I., Visualization and in situ analysis of leukocyte trafficking into the ankle joint in a systemic murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2005 52 (10): 3269-3278.

Gearing A. J. & Newman, W.: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*, 1993 14: 506-512.

Gierer P., Röther J., Mittlmeier T., Gradl G., Vollmar B., Ebselen reduces inflammation and microvascular perfusion failure after blunt skeletal muscle injury of the rat. *J Trauma.*, 2010 68: 853–858.

Gierer P., Ibrahim S., Mittlmeier T., Koczan D., Landes J., Gradl G., Vollmar B., Gene expression profile and synovial microcirculation at early stages of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2005 7: 868-876.

Ginsberg M. H., Integrin activation. *BMB Reports*, 2014 47 (12): 655-659.

Golan I., Expression of extra trinucleotide in CD44 variant of rheumatoid arthritis patients allows generation of disease-specific monoclonal antibody. *J Autoimmun*, 2007 28 (2-3): 99-113.

Gross W. L., Anti-Citrullinated Protein-Peptide Antibodies in Rheumatoid Arthritis *Dtsch Arztebl Int*, 2009 106 (10): 157–8

Harder Y., Schmauss D. , Wettstein R., Egaña J.T., Weiss F., Weinzierl A., Schuldt A., Machens H.-G., Menger M. D., Rezaeian F., Ischemic Tissue Injury in the Dorsal Skinfold Chamber of the Mouse: A Skin Flap Model to Investigate Acute Persistent Ischemia. *J Vis Exp.*, 2014: 93.

Harell, G.S., The intraluminal distribution of 15-micrometer-diameter carbonized microspheres within arterial microvessels as determined by vital microscopy of the golden hamster cheek pouch. *Microvasc Res.*, 1979 18: 384-402.

Harris, A.G., An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp.*, 1997 17 (6): 322-327.

Haynes B.F., Hale L.P., Patton K.L., Martin M.E., McCallum R.M., Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-regulation of

the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1991 34: 1434-1443.

Haynes, B.F., CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today*, 1989 10 (12): 423-438.

Heath, H., Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of 8CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J Clin Invest.*, 1997 99 (2): 178-184.

Hegen M., Keith J.C. Jr., Collins M., Nickerson-Nutter C.L., Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2008 67: 1505–1515

Henzgen, S., Degradation of articular cartilage during the progression of antigen-induced arthritis in mice. A scanning and transmission electron microscopic study, in *Exp Toxicol Pathol.*, 1996 48 (4): 255-263.

Hevers W., Hadley S.H., Lüddens H., Amin J., Ketamine, but not phencyclidine, selectively modulates cerebellar GABA(A) receptors containing alpha6 and delta subunits. *J. Neurosci.*, 2008 20: 28

Highton, J., Antigen-induced (Dumonde Glynn) arthritis in the sheep: a large joint animal model of arthritis. *Clin Exp Rheumatol.*, 1997 15 (1): 25-31.

Holmdahl R., Tarkowski A., Jonsson R., Involvement of macrophages and dendritic cells in synovial inflammation of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice and spontaneous arthritis in MRL/lpr mice. *Autoimm.*, 1991 8: 271-280.

Holmdahl, R., Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. *APMIS*, 1989 97 (7): 575-584.

Hubbard, A. K., Rothlein R., Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic.Biol.Med.*, 2000 28: 1379-1386.

Hunneyball I.M., Crossley M.J., Spowage M., Antigen-induced arthritis in mice. *Br J Clin Pract Suppl.*, 1986 43: 13-20.

Ibrahim S.M., Yu X., Dissecting the genetic basis of rheumatoid arthritis in mouse models. *Curr Pharm Des.*, 2006 12 (29): 3753-3759.

Jalkanen S., Jalkanen M., Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol.*, 1992 116: 817-825.

Jbeily N., Comparative suitability of CFDA-SE and rhodamine 6G for in vivo assessment of leukocyte-endothelium interactions. *J Biophotonics*, 2014 7(6): 369-375.

Jones M., Tussey L., Athanasou N., Jackson D.G., Heparan sulfate proteoglycan isoforms of the CD44 hyaluronan receptor induced in human inflammatory macrophages can function as paracrine regulators of fibroblast growth factor action. *J Biol Chem.*, 2000 275 (11): 7964-7974.

Kannan K., Ortmann R.A., Kimpel D., Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*, 2005 12 (13): 167-181.

Kansas G. S., Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 1996 88: 3259-3287.

Karanikolas G., Charalambopoulos D., Vaiopoulos G., Adjunctive anakinra in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate, or leflunomide, or cyclosporin-A monotherapy: a 48-week, comparative, prospective study. *Rheumatology*, 2008 47: 1384-1388.

Keffer J., Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J.*, 1991 10 (13): 4025-4031.

Ketamin-hameln 50mg/ml, *Fachinformation*, 2015

Kirveskari J., Helinto M., Saaren-Seppala H., Renkonen R., Tervo T., Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. *Exp Eye Res.*, 2003 77: 387-390.

Klareskog L., Amara K., Malmstrom V., Adaptive immunity in rheumatoid arthritis: anticitrulline and other antibodies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.*, 2014 16 (1): 72-79.

Klareskog L., Padyukov L., Alfredsson L., Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol.*, 2007 19 (1): 49-54.

Kleinert S., Krueger K., Cardiovascular comorbidity and its risk factors in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol.*, 2011 70 (6): 464-472.

Klyszcz T., Junger M., Jung F., Zeintl H., Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech.*, 1997 42: 168-175.

Koch A.E., Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: Future targets? *Arthritis & Rheumatology*, 2005 52: 710-721

Kong Y.Y., Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 1999 402(6759): 304-309.

Korganow A.S., From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins, *Immunity.*, 1999 10 (4): 451-461.

Kouskoff V., Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity, *Cell.*, 1996 87 (5): 811-822.



Lawrence M. B., Springer T. A., Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol.*, 1993 151: 6338-6346.

Ledebur H. C., Parks T. P., Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol.Chem.*, 1995 270: 933-943.

Liew F.Y., T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat Rev Immunol.*, 2002 2 (1): 55-60.

Lilly C.M., Daugherty B.L., A novel LPS-inducible CCR3 activator: why so many CCR3 ligands? *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2001 25 (6): 673-675.

Liu X., Zhang H., Chang X., Shen J., Zheng W., Xu Y., Wang J., Gao W., He S., Upregulated expression of CCR3 in rheumatoid arthritis and CCR3-dependent activation of fibroblast-like synoviocytes. *Cell Biol Toxicol.*, 2017 33 (1): 15-26.

Loetscher P., The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem.*, 2001 276 (5): 2986-2991.

Löscher W., Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 7. Vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, *Paul Parey Verlag* 2006.

Lyck R.; Enzmann G., The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Current opinion in hematology*, 2015 22 (1): 53-59.

Marhaba R., CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med.*, 2008 8 (8): 784-804.

McEver R.P., Moore K.L., Cummings R.D., Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol.Chem.*, 1995 270: 11025-11028.

McInnes, I.B., Schett G., Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Nat Rev Immunol.*, 2007 7 (6): 429-442.

McNamee K., Williams R., Seed M., Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? *Eur J Pharmacol.*, 2015 759: 278-286

Menger M.D., Richter S., Yamauchi J.I., Vollmar B., Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. *Ann Acad Med Singapore*, 1999 28: 542-556.

Meyer O., Labarre C., Dougados M. et al., Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis*, 2003 62: 120–6.

Mikecz K., Brennan F.R., Kim J.H., Glant T.T., Anti-CD44 treatment abrogates tissue oedema and leukocyte infiltration in murine arthritis. *Nat Med.*, 1995 1: 558-563.

Mikecz K., Dennis K., Shi M., Kim J.H., Modulation of hyaluronan receptor (CD44) function in vivo in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999 42 (4): 659-668.

Muller W.A., Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. *Annual review of pathology.*, 2011 6: 323-344.

Muller W.A., PECAM: regulating the start of diapedesis. Adhesion Molecules: Function and Inhibition., *Birkhauser* 2007: 201–220.

Naor D., Nedvetzki S., CD44 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*, 2003 5: 105-115.

Nedvetzki S., Walmsley M., Alpert E., Williams R.O., Feldmann M., Naor D., CD44 involvement in experimental collagen-induced arthritis (CIA). *J Autoimmun.*, 1999 13: 39-47.

Nitzan M., Mahler Y., Roberts V.C., The transient thermal clearance method for regional blood flow measurement the influence of tissue heat conduction. *Microvasc Res.*, 1988 9: 285-304.

Nolte D., Zeintl H., Steinbauer M., Pickelmann S., Messmer K., Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp.* 1995 15: 244-249.

Ochi H., T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J Exp Med.*, 1999 190 (2): 267-280.

Okada Y., Wu D., Trynka G., Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*, 2014 506 (7488): 376-381.

Palomino D.C.T., Marti L.C., Chemokines and immunity. *Einstein*, 2015 13 (3): 469-473.

Pearson C.M., Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 1956 91 (1): 95-101.

Pettit, A.R., TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis, *Am J Pathol.*, 2001 159 (5): 1689-1699.

Picker L.J., Nakache M., Butcher E.C., Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Bio.l*, 1989 109 (2): 927-937.

Ponta, H., Sherman L., Herrlich P.A., CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2003 4 (1): 33-45.

Protin U., Schweighoffer T., Jochum W., Hilberg F., CD44-Deficient Mice Develop Normally with Changes in Subpopulations and Recirculation of Lymphocyte Subsets. *J Immunol*, 1999 163 (9): 4917-4923.

Proudfoot A.E., Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.*, 2002 2 (2): 106-115.

Pure, E., Cuff C.A., A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med.*, 2001 7 (5): 213-221.

Rosloniec E.F., Cremer M., Kang A.H., Myers L.K., Brand D.D., Collagen- induced arthritis. *Curr Protoc Immunol.*, 2010 89 (15): 1-23.

Roudier J., The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.*, 1988 27 (4): 367-371.

Saetzler R.K., Jallo J., Lehr H.A., Philips C.M., Vasthare U., Arfors K.E., Tuma R.F., Intravital Fluorescence Microscopy: Impact of Light-induced Phototoxicity on Adhesion of Fluorescently Labeled Leukocytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2016 45 (4): 505-513.

Sallusto F., Lanzavecchia A., Mackay C.R., Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today*, 1998 19 (4): 568-754.

Sallusto F., Mackay C.R., Lanzavecchia A., Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*, 1997 277(5334): 2005-2007.

Svetlicky N., Kivity S., Odeh Q., et al. Anti-citrullinated-protein-antibody-specific intravenous immunoglobulin attenuates collagen-induced arthritis in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 2015 182(3): 241-250.

Saumet J.L., Dittmar A., Leftheriotis G., Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp.*, 1986 5: 73-83.

Schlesinger M., Bendas G., Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int. J. Cancer*, 2015 136 (11): 2504-2514.

Schmitt-Sody M., Klose A., Gottschalk O., Metz P., Gebhard H., Zysk S., Eichhorn M. E., Hernandez-Richter T. M., Jansson V., Veihelmann A.: Platelet-endothelial cell interactions in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005 44 (7): 885-889.

Schnoor M., Endothelial Actin-Binding Proteins and Actin Dynamics in Leukocyte Transendothelial Migration, *The Journal of Immunology* 2015 194 (8): 3535-3541.

Schwab J.H., Superantigen can reactivate bacterial cell wall-induced arthritis. *J Immunol*, 1993 150 (9): 4151-9.

Sehnert B., Gierer P., Ibrahim S., Kühl A., Voll R., Nandakumar K.S., Holmdahl R., Hallmann R., Vollmar B., Burkhardt H., Modulation of granulocyte-endothelium interactions by antileukoproteinase: inhibition of anti-type II collagen antibody-induced leukocyte attachment to the synovial endothelium. *Arthritis Res Ther.*, 2006 8: 95.

Smeets T.J., Poor expression of T cell-derived cytokines and activation and proliferation markers in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol., Academic Press.*, 1998 88 (1): 84-90.

Smolen J.S., Aletaha D., Redlich K., The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol.*, 2012 8 (4): 235-243.

Springer T.A., Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.*, 1994 76 (2): 301-314.

Stastny P., Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.*, 1976 57 (5): 1148-1157.

Steinbauer M., Harris A.G., Abels C., Messmer K., Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg.*, 2000 385 (4): 290-298.

Stoop R., Gál I., Glant T.T., et al. Trafficking of CD44-deficient murine lymphocytes under normal and inflammatory conditions. *Eur J Immunol.*, 2002 32: 2532–2542.

Stoop R., Kotani H., McNeish J.D., Otterness I.G., Mikecz K., Increased resistance to collagen-induced arthritis in CD44-deficient DBA/1 mice. *Arthritis Rheum.*, 2001 44: 2922-2931.

Symmons, Deborah P. M., Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2002 16: 707-722.

Syversen S.W., Gaarder P.I., Goll G.L. et al., High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study. *Ann Rheum Dis*, 2008 67: 212–7.

Tachimoto H., CCR3-active chemokines promote rapid detachment of eosinophils from VCAM-1 in vitro. *J Immunol.*, 2000 165 (5): 2748-2754.

Tak P.P., et al., Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Rheum.*, 2001 44 (8): 1897-1907.

Terpe H.J., CD44 variant isoforms are preferentially expressed in basal epithelial of non-malignant human fetal and adult tissues. *Histochemistry*, 1994 101 (2): 79-89.

The Research Sub-Committee Of The Empire Rheumatism, Gold Therapy in Rheumatoid Arthritis: Final Report of a Multicentre Controlled Trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1961 20 (4): 315-334.

Tillmanns H., Neumann F.J., Tiefenbacher C., Dorigo O., Parekh N., Waas W., Zimmermann R., Steinhausen M., Kuebler W., Activation of neutrophils in the microvasculature of the ischaemic and reperfused myocardium. *Eur Heart J.*, 1993 14: 82-86.

Trentham D.E., Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1982 25: 911-916.

Trentham, D.E., Townes A.S., Kang A.H., Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med.*, 1977 146: 857-868.

Tu-Rapp H., Pu L., Marques A., Kulisch C., Yu X., Gierer P., Ibrahim S. M., Vollmar, B., Genetic control of leucocyte--endothelial cell interaction in collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2010 69: 606-610.

Uysal H., Bockermann R., Nandakumar K.S. et al., Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *J Exp Med.*, 2009 206: 449–62

Van Lent P.L., Holthuysen A.E., Van Rooijen N., Van De Putte L.B., Van Den Berg W.B., Local removal of phagocytic synovial lining cells by clodronate-liposomes decreases cartilage destruction during collagen type II arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 1998 57 (7): 408–413.

Veihelmann A., Harris A.G., Krombach F., Schütze E., Refior H.J., Messmer K., In vivo assesment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse Antigen-induced arthritis. *Microcirculation*, 1999 6: 281-290.

Veihelmann A., Szczesny G., Nolte D., Krombach F., Refior H.J., Messmer K., A novel model for the study of microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Res Exp Med* 1998 198: 43-54.

Verdrengh M., Holmdahl R., Tarkowski A., Administration of antibodies to hyaluronan receptor (CD44) delays the start and ameliorates the severity of collagen II arthritis. *Scand J Immunol.*, 1995 42: 353-358.

Vestweber D., Wessel F., Nottebaum A.F., Similarities and differences in the regulation of leukocyte extravasation and vascular permeability. *Semin Immunopathol.*, 2014 36 (2): 177-192.

Villringer A., Haberl R.L., Dirnagl U., Anneser F., Verst M., Einhüpl K.M., Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res.*, 1989 504: 159-160.

Vollmar B., Conzen P.F., Kerner T., Habazettl H., Vierl M., Waldner H., Peter K., Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg.*, 1992 75: 421-430.

Vollmar B., Lang G., Post S., Menger M.D., Messmer K., Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function. *Zentralbl Chir.*, 1993 118: 218-225.

Vollmar B., Preissler G., Menger M.D., Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas. *Am J Physiol.*, 1994 267: 1936-1940.

Wagner U.G., et al., The role of CD8<sup>+</sup> CD40L<sup>+</sup> T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Immunol.*, 1998 161 (11): 6390-6397.

Weber G.F., et al., Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, 1996 271(5248): 509-512.

Williams R.O., Synergy between anti-CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994 91 (7): 2762-2766.

Wittchen E.S., van Buul J.D., Burridge K., Worthyake R.A., Trading spaces: Rap, Rac, and Rho as architects of transendothelial migration. *Curr Opin Hematol.*, 2005 12: 14-21

Wooley P. H., The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2004 18 (1): 47–58.



Wright M., Pharmacologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc.*, 1982 180:1462-1471.

Yoo D.H., Recent Trend in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J Korean Orthop Assoc.*, 2010 45 (6): 419-425.

Zeintl H., et al., Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp.*, 1989 8: 293-302.

Zöller M., CD44, Hyaluronan, the Hematopoietic Stem Cell, and Leukemia-Initiating Cells. *Frontiers in Immunology*, 2015 6: 235.

## 7 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACPA	Anti citrullinated peptide/protein antibodie
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
ALP	Antileukoproteinase
AS	Aminosäure
CAIA	Anti-Kollagen II Antikörper-induzierte Arthritis
CD	Cluster of differentiation
CFA	Komplettes Freund`sches Adjuvans
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CRP	C-reaktives Protein
CII	Kollagen II
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii, und andere
FCD	Funktionelle Kapillardichte
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
g	Gramm
h	Stunden
HLA	Humanes leukozytäres Antigen
IVIg	Immunglobulintherapie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
IL	Interleukin
IVM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
kd	Kilodalton

KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharide
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MHC	Major Histokompatibility Komplex
mind.	mindestens
mm	Millimeter
n	Number, Anzahl
NaCl	Kochsalzlösung NF- $\kappa$ B nuclear factor kappa B nm Nanometer
NOD	non obese diabetes
p	statistisches Signifikanzniveau
PBS	Phosphate buffered Saline
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
pH	pH-Wert
RA	Rheumatoide Arthritis
s	Sekunden
s.c.	Subkutan
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sog.	Sogenannt
TCR	T-Zell Rezeptor
TMD	Transmembran-Domäne
TEM	Transendotheliale Migration
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VCAM-1	Vasculares Zelladhesionmolecule
vRBC	venöse Erythrozytengeschwindigkeit
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Philip Gierer für seine unerschöpfliche Geduld in der Einführung in die praktische und theoretische Welt der medizinischen Wissenschaft. Er ist ein Vorbild für die Verbindung von erfolgreicher klinischer Praxis wissenschaftlichem Einsatz.

Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar des Instituts für Experimentelle Chirurgie möchte großzügige zeitliche räumliche Unterstützung danken.

Ein großer Dank gebührt den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie, ohne deren zuverlässige Arbeit diese Studie nie möglich gewesen wäre.

Meiner Familie gilt jedoch der größte Dank.

Besonders meiner Ehefrau Madeleine Sanguinette, die mir so oft es ging den Rücken freigehalten hat sowie meinen Kindern Jean Philipe, Pierre Maurice und Frédéric Etienne Sanguinette möchte ich für die oft wichtige Zerstreuung und für die Wertschätzung meiner Arbeit danken.

Auch meinen Eltern Gret-Doris Klemkow und Peter Olaf Lembcke möchte ich danken. Sie haben all dies erst möglich gemacht.

## Lebenslauf

### Schulbildung:

09/86 - 07/92	Erich-Weinert-Oberschule
09/92 - 07/98	Sportgymnasium Schwerin
Schulabschluss:	Abitur

### Berufsausbildung:

09/99 - 08/02	Medizinische Fachschule am Klinikum Schwerin
Abschluss:	examiniertes Physiotherapeut

### Studium:

10/02 – 10/08	Universität Rostock: Humanmedizin
Approbation als Arzt:	16.12.2008 (Ärztliche Prüfung am 23.10.2008)

### Ärztliche Tätigkeiten als Weiterbildungsassistent:

01/09 – 12/09	Orthopädische Universitätsklinik Rostock Leiter: Herr Prof. Dr. med. W. Mittelmeier
01/10 – 12/11	Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Leiter: Herr Prof. Dr. med. Th. Mittlmeier
01/12 – 08/12	Orthopädische Universitätsklinik Rostock Leiter: Herr Prof. Dr. med. W. Mittelmeier
09/12 – 08/13	Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Leiter: Frau Prof. Dr. med. G. Nöldge-Schomburg
09/13 – 09/16	Orthopädische Universitätsklinik Rostock Leiter: Herr Prof. Dr. med. W. Mittelmeier
08/2016	Facharzt für Orthopädie/Unfallchirurgie
08/16 – in Beschäftigung	Orthopädische Universitätsklinik Rostock Leiter: Herr Prof. Dr. med. W. Mittelmeier

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 31.08.2017

## Thesen zur Dissertation

„Die Rolle von CD44 und CCR3 bei der rheumatoiden Arthritis in einem Tiermodell der antigeninduzierten Arthritis“

1. Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung vor allem des Bewegungssystems mit einer Prävalenz von ca. 1-2%. Die derzeitigen Therapieoptionen erlauben nur eine Remission des Krankheitsverlaufs. Eine kausale Therapie ist bisher nicht möglich. Bei aggressivem Verlauf kann es frühzeitig zu einer Invalidität und Arbeitsunfähigkeit kommen. Die Mortalität gegenüber Normalbevölkerung ist gesteigert. Klinische Studien zeigen einen Wandel von globaler systemischer Therapie hin zur Antigen-Targeting-Therapie.
2. Ätiologie und Pathogenese werden zunehmend besser verstanden, aber ein vollständiges Wissen existiert noch nicht. Momentane vielversprechende Ansätze liegen in der Erforschung einer gestörten Autoimmunität, genetischer Prädispositionen, exogener Faktoren oder in der Kombination dieser Komponenten.
3. Die gesteigerte Leukozyten-Endothel-Interaktion ist ein zentrales Element in der Pathogenese der RA. Durch die Beeinflussung der synovialen Inflammation kommt es zu einer Veränderung der Inflammationskaskade.
4. Ein besseres, detailliertes und mechanistisches Verständnis zur Initiation der rheumatoiden Arthritis ist die Voraussetzung für die Entwicklung neuer, effizienter Therapieansätze.
5. Tiermodelle dienen einer möglichst getreuen Imitation von humanen Erkrankungen und sind momentan alternativlose Modelle um die Pathogenese und Therapieoptionen *in vivo* abzubilden, ohne dass diese durch hohe Varianz von Genetik und exogenen Faktoren verfälscht werden.
6. Die CFA/Kollagen II-induzierte-Arthritis (CIA) ist ein viel genutztes Tiermodell zur rheumatoiden Arthritis. Die Auflichtilluminationsfluoreszenzmikroskopie kann

die synoviale Mikrozirkulation des Kniegelenkes *in vivo* darstellen. Dabei wird sowohl die Mikrohämodynamik als auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfasst.

7. Der C-C-Chemokin-Rezeptor Type 3 (CCR3/CD193) ist G-Protein-gekoppelt und bindet und reagiert mit einer Vielzahl von Chemokinen. Die Hauptpopulation für CCR3<sup>+</sup>-Zellen im arthritischen Gelenk sind die Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten. Im peripheren Blut sind es vor allem CD14<sup>+</sup> Zellen (Monozyten, Makrophagen) und CD90<sup>+</sup> (=Thy-1) Leukozyten.
8. In arthritissensiblen Stämmen könnte die Inhibition von Leukozyten-Endothel-Interaktion durch die Injektion eines monoklonalen Antikörpers gegen CCR3 bei DBA/1J-Mäusen und durch den CD44-Knockout bei B10.Q-Tieren Bedeutung erlangen
9. In den für Arthritis empfänglichen Mausstämmen (DBA/1J, B10.Q) trat nach Arthritisinduktion eine zelluläre Immunantwort mit veränderter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auf.
10. Die mehrmalige Injektion des monoklonalen Antikörpers gegen CCR3 könnte in der Frühphase der CIA zu einer Reduktion der zellulären Inflammation führen.
11. Der CD44-Knockout an B10.Q-Tieren lässt eine klinisch unauffällige Mausentwicklung zu. In der Frühphase einer CIA kann es zu einer Reduktion der zellulären Inflammation.
12. Die Reduktion der synovialen Leukozytenadhärenz und Vermeidung einer Inflammation durch die gezielte Adressierung von CCR3 und CD44 ist möglich und könnte von therapeutischer Bedeutung sein.
13. Durch Ausweitung der Untersuchungsgruppen und ggf. Verstärkung der Immunisierung könnten die Ergebnisse weiter gestärkt werden.